

In vivo*-Analysen zur Funktion bakterieller RNase P-Proteine in *Bacillus subtilis

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich

Pharmazeutische Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Markus Gößringer

aus Isny/Allgäu

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazeutische Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: _____ Prof. Dr. rer. nat. Roland K. Hartmann

Zweitgutachter: _____ PD. Dr. rer. nat. Mario Mörl

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ribozyme	1
1.2 Sekundär- und Tertiärstrukturen von RNAs	2
1.3 Ribonuklease P (RNase P)	3
1.3.1 Substrate der bakteriellen RNase P und Substraterkennung	4
1.3.2 Der Katalysemechanismus der RNase P-RNA	8
1.3.3 Die RNase P-RNA-Untereinheit	9
1.3.4 Die bakterielle RNase P-Protein-Untereinheit	13
2 Zielsetzung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Chemikalien	17
3.1.2 Geräte	19
3.1.3 Sonstige Hilfsmittel	21
3.1.4 Antikörper	22
3.1.4.1 Primärantikörper	22
3.1.4.2 Sekundärantikörper	22
3.1.5 Enzyme	22
3.1.6 Synthetische DNA-Oligonukleotide für die PCR und Detektion	23
3.1.7 Verwendete Bakterienstämme	25
3.1.8 Verwendete Plasmidvektoren	25
3.1.9 Verzeichnis verwendeter Medien und Puffer	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Bakterielle Zellkultur	27
3.2.1.1 Sterilisation	27
3.2.1.2 Zellaufzucht in Flüssigmedium	27
3.2.1.3 Zellaufzucht auf Agarplatten	28
3.2.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	28
3.2.2.1 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	29
3.2.2.2 Transformation von <i>B. subtilis</i> -Zellen	30
3.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken	32
3.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.3.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
3.2.3.4 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	36

3.2.3.5 Phenol-/Chloroform-Extraktion	37
3.2.3.6 Alkohol-Fällung	37
3.2.3.7 Konzentrierung von Nukleinsäuren mittels der <i>Speed Vac</i>	38
3.2.4 DNA-Techniken	39
3.2.4.1 Präparation von Gesamt-DNA aus <i>B. subtilis</i> -Zellen	39
3.2.4.2 Präparation von chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i> -Zellen	39
3.2.4.3 Präparation von Plasmid-DNA	39
3.2.4.4 Restriktionsspaltung von DNA	42
3.2.4.5 Dephosphorylierung von DNA	43
3.2.4.6 5'-Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden	44
3.2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten	45
3.2.4.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
3.2.4.9 <i>Southern Blot</i>	48
3.2.5 RNA-Techniken	50
3.2.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>B. subtilis</i> -Zellen	51
3.2.5.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	52
3.2.6 Proteinbiochemische Methoden	54
3.2.6.1 Trichloressigsäure- (TCA-) Fällung	54
3.2.6.2 Analytische SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.2.6.3 Protein- <i>Blotting</i> (<i>Western Blot</i>)	58
3.2.6.4 Immundetektion	59
3.2.6.5 Expression rekombinanter Proteine in <i>B. subtilis</i>	61
3.2.6.6 Aufreinigung von RNase P-Protein unter denaturierenden Bedingungen	63
3.2.6.7 Aufreinigung zellulärer RNase P-Komplexe unter nativen Bedingungen und Aktivitäts-Assay	65
4 Ergebnisse und Diskussion	68
4.1 Konstruktion und Charakterisierung einer <i>B. subtilis</i>-Mutante mit inhibierbarer <i>rnpA</i>-Genexpression	68
4.1.1 Konstruktion der Genfusion zwischen dem Xylose-Promotor und dem <i>rnpA</i> -Gen	68
4.1.2 Konstruktion von Vektoren zur Integration der $P_{xyI}::rnpA$ -Genfusion ins Chromosom von <i>B. subtilis</i> YB886	72
4.1.3 Chromosomale Integration der $P_{xyI}::rnpA$ -Genfusionen in <i>B. subtilis</i>	78
4.1.4 PCR-Analyse der chromosomalen Regionen nach der homologen Rekombination	80
4.1.5 Überexpression des Xylose-Repressors (XylR) im <i>B. subtilis</i> -Stamm sb	83

4.1.6 Analyse der chromosomal integrierten $P_{xyI}::rnpA$ -Genfusionen mittels der <i>Southern Blot</i> -Methode	86
4.1.7 Analyse der <i>rnpA</i> -Genexpression in <i>B. subtilis</i> -Stamm d7 mittels RT-PCR	88
4.2 Komplementationsanalysen	90
4.2.1 Homologe Komplementationsanalysen	90
4.2.2 Heterologe Komplementationsanalysen	94
4.2.2.1 Wachstumsanalyse nach der Transformation heterologer <i>rnpA</i> -Expressionsvektoren in Stamm d7	98
4.2.2.2 Analyse der <i>rnpA</i> -Transkription in den transformierten d7-Stämmen mittels RT-PCR	103
4.2.2.3 Identifizierung der heterologen RNase P-Proteine in den transformierten d7-Stämmen mittels der <i>Western Blot</i> -Analyse	106
4.3 Aufreinigung von RNase P-Holoenzym aus Stamm d7	108
4.3.1 Überexpression und Nachweis des P-Proteins in Stamm d7	109
4.3.2 Isolierung des P-Proteins mit N-terminalem Oligo-Histidin-Anker unter denaturierenden Bedingungen	113
4.3.3 Aufreinigung von RNase P-Holoenzym aus Stamm d7 nach Überexpression von Protein-/und RNA-Untereinheit	115
4.4 Ausblick	119
5 Zusammenfassung	125
6 Literaturverzeichnis	127
Anhang	148
A Lebenslauf	148
B Eigene Publikationen	149
C Danksagung	150
D Selbstständigkeitserklärung	151

Abkürzungen und Einheiten

A ₂₆₀	Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge
Abb.	Abbildung(en)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C5	Proteinuntereinheit der RNase P von <i>E. coli</i>
cam	Chloramphenicol
C _{end}	Endkonzentration
cpm	<i>counts per minute</i> (radioaktive Zerfälle pro Minute)
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ε	molarer Extinktionskoeffizient
ε ₂₈₀	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm Wellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm; Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₂ O _{bidest}	zweifach deionisiertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

Abkürzungen und Einheiten

konz.	konzentriert
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	molar [mol/l]
m	Meter
MBq	Megabecquerel
mg	Milligramm
min	Minute
MW	Molekulargewicht
NBT	p-Nitroblau-tetrazoliumchlorid
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotetraessigsäure
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleosidtrisphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte/Extinktion bei 600 nm Wellenlänge
p.a.	<i>pro analysi</i> (für die Analyse; Bezeichnung des Reinheitsgrades)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)
pmol	Picomol
P-Protein	Proteinuntereinheit der RNase P von <i>B. subtilis</i>
P-RNA	RNA-Untereinheit der RNase P von <i>B. subtilis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T _M	Schmelzpunkt
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

Abkürzungen und Einheiten

U	Unit(s) (Einheit für Enzymaktivität)
ü.N.	über Nacht
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
XCB	Xylencyanolblau
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl β -D-Galactopyranosid

Präfixe vor Einheiten:	f	Femto (10^{-15})	k	Kilo (10^3)
	p	Pico (10^{-12})	M	Mega (10^6)
	n	Nano (10^{-9})	G	Giga (10^9)
	μ	Mikro (10^{-6})	T	Terra (10^{12})
	m	Milli (10^{-3})		

1 Einleitung

1.1 Ribozyme

Anfang der achtziger Jahre entdeckten die Arbeitsgruppen von T.R. Cech und S. Altman, daß bestimmte Ribonukleinsäuren (RNAs) von Protozoen und Bakterien katalytisch aktiv sind (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983). Derartige Ribonukleinsäure Enzyme (Ribozyme) konnten inzwischen in praktisch allen Organismen nachgewiesen werden und spielen bei verschiedenen biologischen Vorgängen wie beispielsweise dem RNA-Spleißen, dem RNA-Prozessieren, der Replikation von RNA-Genomen und der Bildung von Peptidbindungen während der Translation eine essentielle Rolle (Eckstein und Lilley, 1996; Ban et al., 2000; Muth et al., 2000; Nissen et al., 2000). Die Katalyseeigenschaft der RNA-Moleküle hängt analog den Proteinenzymen mit ihrer Eigenschaft zusammen, spezifische Sekundär- und Tertiärstrukturen annehmen zu können. Divalente Metallionen erleichtern die Ausbildung der katalytischen Zentren (*active sites*) und spielen in einigen Fällen eine direkte Rolle bei der Katalyse.

Die Ribozyme können in vier Gruppen eingeteilt werden: (1) das Ribosom, (2) die selbstspleissenden Introns (der Gruppe I und Gruppe II), (3) die RNase P bzw. RNase MRP und (4) die kleinen katalytischen RNAs (*hammerhead*-, *hairpin*-, Hepatitis Delta Virus-(HDV-) und Varkud Satellite-(VS-) Ribozym). Mit Ausnahme des Ribosoms katalysieren natürlich vorkommende Ribozyme die sequenzspezifische Spaltung oder Ligation von RNA-Phosphodiester-Bindungen. Das Ribosom und die RNase P bzw. RNase MRP - die im Komplex mit Proteinen vorliegen - sind die einzigen bislang entdeckten natürlich vorkommenden Vertreter von *in trans* aktiven Ribozymen. Die anderen aufgezählten Ribozyme besitzen alle eine intramolekulare katalytische Aktivität (*cis*-Aktivität). Die *cis*-aktiven Ribozyme können jedoch teilweise durch artifizielle Spaltung in einer zwischen den basengepaarten Bereichen liegenden Schleifen-*(loop-)* Region in *trans*-spaltende Ribozyme umgewandelt werden (Uhlenbeck, 1987; Haseloff und Gerlach, 1988; Hampel und Tritz, 1989). Durch Kombination der katalytischen Domäne mit spezifischen flankierenden *antisense*-Sequenzen lassen sich Ribozyme konstruieren, die eine entsprechende Ziel-RNA in *trans* zerschneiden. Auch ist es im Falle der RNase P möglich, externe sequenzspezifische RNAs (external guide sequences, EGS) zu konzipieren, die mit der Ziel-RNA hybridisieren und dadurch Strukturen ausbilden, die dem natürlichen Substrat ähnlich sind (Forster und Altman, 1990; Altman, 1995). Dies ermöglicht den Einsatz von Ribozymen zu biotechnologischen oder gentherapeutischen Zwecken: durch enzymatische Spaltung der mRNA wird die Expression von Genen inhibiert. Darüber hinaus wurden mittels *in vitro*-Selektion neue Ribozyme identifiziert (Beaudry und Joyce, 1992; Bartel und Szostak, 1993).

Dies erweiterte das Repertoire an Reaktionen, die durch RNA-Enzyme katalysiert werden. Darunter fallen die Bildung von Ester- und Amidbindungen, die Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen und die Insertion von Metallionen in Porphyrin-Ringe. Auch gelang die Selektion und Konzeption von Ribozymen, deren Aktivität über die Wechselwirkung mit Co-Enzymen bzw. allosterischen Regulatoren kontrolliert werden kann (Koizumi et al., 1999; Komatsu et al., 2002).

1.2 Sekundär- und Tertiärstrukturen von RNAs

RNAs können vergleichbar den Proteinen komplexe dreidimensionale Strukturen einnehmen, durch die chemische Gruppen für die Katalyse, die Übermittlung genetischer Information oder Strukturzwecke präzise positioniert werden.

Die Sekundärstruktur der RNA wird insbesondere durch Watson-Crick-Basenpaarungen und dazwischenliegende „ungepaarte“ Bereiche bestimmt. Die basengepaarten Bereiche bilden in der Regel A-Helices. Sekundärstrukturelemente sind Helices, Einzelstrang-Bereiche (innere Schleifen und Verbindungsstellen), Haarnadelschleifen (*hairpins*) und Ausstülpungen (*bulges*).

Bei der Ausbildung der Molekülstruktur spielen die tertiären Wechselwirkungen eine maßgebliche Rolle. Tertiärstrukturen, die vor allem durch die Interaktion zwischen verschiedenen Sekundärstrukturelementen entstehen, können allgemein in drei Kategorien eingeteilt werden: (1) Wechselwirkungen zwischen zwei doppelsträngigen helicalen Bereichen, (2) Wechselwirkungen zwischen einem helicalen Bereich und einem nicht-doppelsträngigen Bereich und (3) Wechselwirkungen zwischen zwei nicht-helicalen Bereichen (Westhof und Michel, 1994). Die coaxiale Stapelung helicaler Bereiche ist ein grundlegendes Prinzip, durch das in RNAs eine komplexere Organisation erreicht wird. Eine Wechselwirkung zwischen Helices kann darüber hinaus über die 2'-Hydroxygruppen der Ribose des RNA-Rückgrats und über die sogenannte Adenosinplattform (A-Plattform) - welche eine Stelle für eine Basenstapelung schafft - vermittelt werden (Holbrook et al., 1991; Cate et al., 1996). Einzelsträngige Abschnitte in vielen großen RNAs dienen scheinbar oft dazu, helicale Regionen über die Bildung von Basentripeln miteinander zu verbinden und in einer definierten Anordnung zu fixieren (Kim et al., 1974; Szewczak et al., 1998). Zu den prominenten Motiven in natürlichen RNAs gehört auch das stabile *Tetra*loop-Motiv, das vorwiegend an die kleine Furche helicaler RNA bindet (Tuerk et al., 1988). Die tertiären Wechselwirkungen zwischen ungepaarten Bereichen werden vorwiegend durch Schleifen-Schleifen-Interaktionen (*kissing complex*) und Pseudoknoten vermittelt (Marino et al., 1995;

Puglisi et al., 1990). Während es bei der Schleifen-Schleifen-Interaktion zu Basenpaarungen zwischen den komplementären Nukleotiden zweier Haarnadelschleifen kommt, ist der Pseudoknoten ein Motiv, in dem Nukleotide einer Haarnadelschleife mit einer komplementären einzelsträngigen Sequenz Basenpaare bilden.

Im ungefalteten Zustand der RNA ist der größte Teil der Sekundärstruktur vorgeformt und der Faltungsprozeß umfasst im wesentlichen die schrittweise Bildung der tertiären Wechselwirkungen bis zur nativen Struktur. Die beschriebenen tertiären Wechselwirkungen leisten daher den wichtigsten Beitrag zur Steuerung des Faltungsvorgangs großer RNAs.

Der Einfluß von ein- und zweiwertigen Metallionen auf die Ausbildung definierter dreidimensionaler RNA-Strukturen muß ebenfalls erwähnt werden. So können die Metallkationen die negativen Ladungen der Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats neutralisieren und auf diese Weise eine kompakte Faltung ermöglichen. Oft dienen sie auch der Stabilisierung von Sekundärstrukturbereichen oder sind bei tertiären Wechselwirkungen involviert (Pley et al., 1994; Scott et al., 1995; Cate et al., 1996). Von besonderer Bedeutung ist das Mg^{2+} -Ion, welches aufgrund seiner hohen Oberflächenladungsdichte als harter Ligand bezeichnet wird und gut mit verschiedenen sauerstoffatomhaltigen Gruppen der RNA koordinieren kann (Pearson, 1963; Saenger, 1984). Die Koordination der sechs Liganden (vorwiegend H_2O) erfolgt mit einer oktaedrischen Geometrie. Potentielle Liganden sind die Nichtbrücken-Sauerstoffatome der Phosphodiestergruppen, die 2'-Hydroxygruppen der Ribose, die Carbonylfunktionen der Basen und – bei der Beteiligung am katalytischen Schritt – die Oxyanionen des Übergangszustandes bei der Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung.

1.3 Ribonuklease P (RNase P)

In allen Lebewesen wird die in der DNA gespeicherte genetische Information mittels Transfer RNAs (tRNAs) in Proteine übersetzt. Die tRNAs werden zunächst als größere Vorläufer-Moleküle (prä-tRNAs) synthetisiert, aus denen die funktionsfähigen, maturen tRNAs erst durch Prozessierung herausgeschnitten werden müssen. Die ubiquitäre Endoribonuklease RNase P ist das für die 5'-Prozessierung der prä-tRNAs essentielle Enzym, das die 5'-Flanken der prä-tRNAs an einer spezifischen Position abspaltet. Mit Ausnahme der RNase P aus Spinatchloroplasten - die anscheinend über keine RNA-Untereinheit verfügt (Thomas et al., 1995) - sind alle bislang charakterisierten RNase P-Enzyme komplexe Holoenzyme, die aus einer RNA- und mindestens einer Protein-Komponente bestehen. Die bakterielle RNase P besteht üblicherweise aus einer 350–400 Nukleotide langen RNA (100-130 kDa) und einem kleinen, basischen Protein von ca 120 Aminosäuren (13-14 kDa). Unter physiologischen Bedingungen und *in vivo* ist die

Proteinuntereinheit für die prä-tRNA-Prozessierung essentiell (Schedl und Primakoff, 1973; Reich et al., 1988). Es konnte jedoch *in vitro* unter hohen Salzbedingungen gezeigt werden, daß die RNA-Untereinheit auch in Abwesenheit der Proteinuntereinheit katalytische Aktivität aufweist (Guerrier-Takada et al., 1983). Es handelt sich bei der bakteriellen RNase P folglich um ein echtes Ribozym.

Die RNase P-Enzyme der Archaea und Eukarya sind komplizierter aufgebaut. Die nukleare RNase P der Hefe beispielsweise besteht aus einer RNA-Untereinheit und neun Proteinuntereinheiten (Chamberlain et al., 1998). Ebenso ist die nukleare humane RNase P aus HeLa-Zellen ein Ribonukleoprotein aus einer RNA-Untereinheit und mindestens zehn Proteinuntereinheiten (Jarrous und Altman, 2001; Van Eenennaam et al., 1999 & 2001). Für die katalytische Aktivität der eukaryontischen RNase P sind die Proteinuntereinheiten unter allen getesteten Bedingungen unerlässlich. Die archaebakteriellen sind den bakteriellen RNase P-RNAs bezüglich Sequenz und Struktur sehr ähnlich, jedoch sind die Proteinuntereinheiten homolog zu den eukaryontischen nuklearen RNase P-Proteinen (Frank et al., 2000; Hall und Brown, 2002). Es konnte zudem demonstriert werden, daß die RNase P-RNA einiger Archaea *in vitro* unter extremen Salzbedingungen auch in Abwesenheit der Proteinuntereinheiten eine katalytische Aktivität aufweist (Pannucci et al., 1999).

1.3.1 Substrate der bakteriellen RNase P und Substraterkennung

In der Zelle werden ca 60 verschiedene tRNAs exprimiert, die sich in ihren jeweiligen Sequenzen voneinander unterscheiden. Allerdings besitzen sämtliche tRNAs gemeinsame Sekundärstrukturmerkmale und daher sehr ähnliche Tertiärstrukturen. So sind beispielsweise das 5'- und 3'-Ende mit zwei Ausnahmen (tRNA^{His} und tRNA^{Sec}) über einen 7-Basenpaar-Stamm (Akzeptor-Arm) verbunden und das 3'-Ende überragt den Stamm mit der Sequenzfolge CCA (Abb. 1.1). Des Weiteren besitzt der Antikodon-Arm eine 7-Nukleotid-Schleife (in dessen Zentrum das Antikodon liegt) und der T-Arm einen 5-Basenpaar-Stamm mit einer 7-Nukleotid-Schleife. Die Substraterkennung durch die RNase P wird demzufolge weniger durch Wechselwirkung mit definierten Sequenzmotiven sondern hauptsächlich über die gemeinsamen strukturellen Merkmale der tRNAs vermittelt. So sind die coaxial gestapelten Helices des Akzeptor-Arms und T-Arms die primären Elemente für die Interaktion mit der RNase P (Kahle et al., 1990; Schlegl et al., 1992; Holm und Krupp, 1992). Die zwischen T-Arm und Antikodon-Arm liegende variable Schleife und der D-Arm spielen dagegen bei der Bindung an die RNase P nur eine indirekte Rolle, da sie die räumliche Fixierung des T-Arms beeinflussen (Hardt et al., 1993; Gaur et al., 1996).

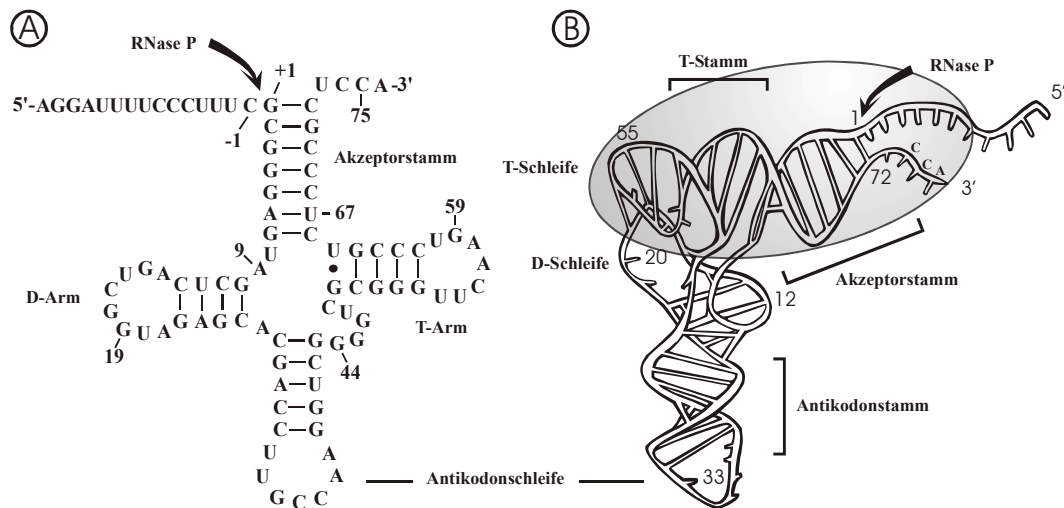


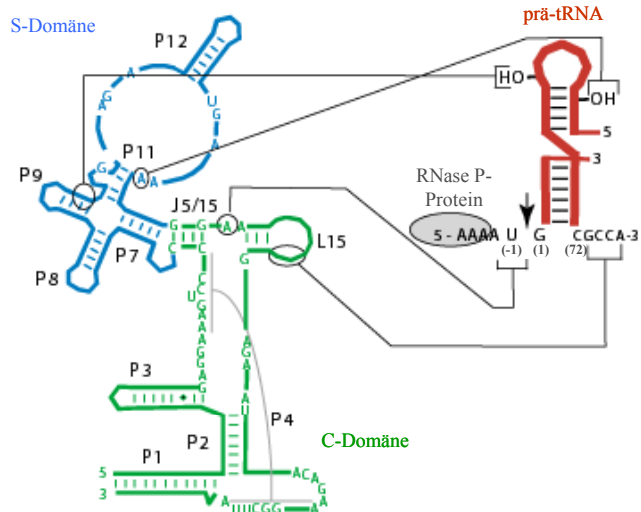
Abb. 1.1: Sekundär- (A) und Tertiärstruktur- (B) der prä-tRNA^{Gly} aus *Thermus thermophilus*. Die Erkennungsregion für die RNase P ist durch das Oval gekennzeichnet (nach Thurlow et al., 1991).

Die Eigenschaft der RNase P, bei Substraten vorwiegend Strukturen anstelle spezifischer Sequenzen zu erkennen, ermöglicht es diesem Ribozym, auch weitere Moleküle zu prozessieren bzw. zu spalten. Vermutlich aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zu den koaxial gestapelten Helices des Akzeptorstamms und T-Arms zählt auch die 4,5S RNA zu den natürlichen RNase P-Substraten (Peck-Miller und Altman, 1991). Ebenfalls prozessiert werden die C4 *antisense* RNAs der Bakteriophagen P1 und P7, die eine terminale Stammregion und eine für die Spaltung essentielle 3'-ACC-Sequenz aufweisen (Hartmann et al., 1995). In Abwesenheit der Proteinkomponente ist die Spaltungseffizienz für diese RNAs jedoch deutlich reduziert. Die tmRNA (\equiv 10Sa RNA) und einige RNAs aus Pflanzenviren tragen terminal tRNA-ähnliche Strukturen, die ebenfalls von der RNase P prozessiert werden (Guerrier-Takada et al., 1988; Komine et al., 1994; Mans et al., 1990). Weiter konnte gezeigt werden, daß auch intergenische Regionen einiger polycistronischer mRNAs (vom *his*-, *tna*-, *secG*- und *rbs*-Operon) Spaltstellen für die RNase P aufweisen (Alifano et al., 1994; Li und Altman, 2003). Auch wenn die Spaltungseffizienz für diese Substrate geringer ist als für prä-tRNAs, so scheint diese RNase P-Aktivität trotzdem einen wichtigen Einfluß auf die Genexpression von Regionen stromabwärts dieser Spaltstellen zu haben.

Die katalytische Domäne der RNase P wird von der RNA-Untereinheit gebildet. An der Substratbindung hingegen sind sowohl die RNA- als auch die Proteinuntereinheit beteiligt. Dabei interagiert die RNA-Untereinheit hauptsächlich mit der muren Domäne der tRNA und die Proteinuntereinheit bindet die 5'-Flanke der prä-tRNA (Altman und Kirsebom, 1999; Kurz und Fierke, 2000). Die bakterielle RNase P-RNA besteht aus zwei Domänen, die sich unabhängig voneinander falten können. Dies sind die Substrat-Bindedomäne (S-Domäne) mit den Helices 7-14 und die katalytische Domäne (C-Domäne) mit den Helices 1-6 sowie 15-18 (Abb. 1.2). Während die S-Domäne mit dem T-Arm und der T-Schleife der prä-tRNA

interagiert, ist die C-Domäne an der Erkennung des Akzeptor-Stamms, der Spaltstelle und der konservierten 3'-NCCA-Sequenz beteiligt (Nolan et al., 1993; Kirsebom und Svard, 1994; LaGrande et al., 1994; Loria und Pan, 1997).

Abb.1.2: Sekundärstruktur der bakteriellen RNase P-RNA (Konsensus-Struktur) und des Akzeptor-/T-Arms der prä-tRNA. Im Text beschriebene Interaktionen zwischen Helices (Präfix P) bzw. Einzelstrangbereichen (Präfix J und L) der RNase P-RNA und spezifischen Elementen der prä-tRNA sind durch schwarze Linien dargestellt. Die Interaktion zwischen dem RNase P-Protein und der 5'-Flanke der prä-tRNA ist durch ein graues Oval symbolisiert. Der Pfeil markiert die Spaltstelle in der prä-tRNA (Abbildung modifiziert nach Harris und Christian, 2003).



Mit Hilfe von Vernetzungs-(*cross-linking*-) Analysen, chemischen Protektionsstudien und Modifikations-Interferenz-Studien konnten einige der an der Substratbindung beteiligten konservierten Positionen der RNase P-RNA genauer identifiziert werden. So interagieren in der S-Domäne beispielsweise Nukleotide in der Helix P9, P10 und P11 (Abb. 1.4) mit dem T-Stamm (Pan et al., 1995; Hardt et al., 1995, 1996; Odell et al., 1998; Heide et al., 1999, 2001). Außerdem deuten experimentelle Daten darauf hin, daß die Sequenzbereiche zwischen den Helices 11 und 12 (J11/12) und den Helices 12 und 13 (J12/13) ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Substraterkennung besitzen (Siew et al., 1999; Heide et al., 2001). Genauer konnten die Kontakte zwischen der C-Domäne und dem Bereich um die Spaltstelle der prä-tRNA beschrieben werden. Hier interagiert die RNase P mit der 3'-terminalen NCCA-Sequenz, mit funktionellen Gruppen der Schnittstelle und mit der 5'-Flanke der prä-tRNA: in *E. coli* bilden die Nukleotide G292 und G293 auf der 3'-Seite der internen Ausstülpung zwischen Helix P15 und P16 (L15/16-Schleife) Watson-Crick-Basenpaarungen mit der CC-Sequenz des 3'-terminalen N(73)C(74)C(75)A(76)-Endes (Oh und Pace, 1994; Svärd et al., 1996; Heide et al., 1999; Busch et al., 2000). Zusätzlich zu diesen Basenpaarungen wurden auch Basentripel beschrieben, die durch G292-C(75)•A258 und G291-A(76)•G259 gebildet werden (Easterwood und Harvey, 1997; Heide et al., 1999, 2001). Die daran beteiligten Positionen A258 und G259 liegen auf der 5'-Seite der internen L15/16-Schleife. Es konnte auch eine Interaktion zwischen der sogenannten Diskriminator-Base der tRNA und der P15/16-Schleife nachgewiesen werden. Diese „73/294“-Interaktion (*E. coli*-Nummerierung) - „73“ entspricht der Diskriminator-Base (N) und „294“ einem konservierten Uridin in der P15/16-Schleife - ist weiterer Bestandteil der NCCA-RNase P-RNA-Wechselwirkung und

dient der Spaltstellenerkennung und Metallionenbindung (Tallsjö et al., 1996; Brännvall et al., 2002, 2003). Zwischen funktionellen Gruppen der Spaltstelle, einschließlich benachbarter Nukleotide, und der RNase P-RNA existiert ein ganzes Netzwerk von weiteren Wasserstoffbrückenbindungen. So sind auch die 2'-Hydroxygruppe der Schnittstelle und das G(1)-C(72)-Basenpaar der prä-tRNA Spezifitätsdeterminanten (Svård und Kirsebom, 1992; Smith und Pace, 1993; Loria und Pan, 1998). Potentielle Interaktionspartner für diese funktionellen Gruppen sind Positionen in J5/15 sowie in J18/2, die im RNase P-RNA-Substrat-Komplex in unmittelbarer Nähe zur Spaltstelle positioniert sind (Christian et al., 1998; Christian und Harris, 1999). Auch trägt die Position N(-1) des prä-tRNA-Substrats zur Spezifität und katalytischen Effizienz bei (Brännvall et al., 2002; Zahler et al., 2003). Diverse Analysen konnten zeigen, daß die N(-1)-Base des Substrats direkt mit einem konservierten Adenosin in J5/15 interagiert (Zahler et al., 2003; Zuleeg et al., 2001). Diese Interaktionen implizieren, daß die bei manchen Substraten vorhandene intramolekulare Wechselwirkung zwischen N(-1) und N(73) zuerst aufgebrochen werden muß, damit die Interaktionen zwischen J5/15 und N(-1) sowie zwischen L15/16 und N(73) zustande kommen können. Schließlich stellt das RNase P-Protein die „dritte Domäne“ des RNase P-Holoenzym dar, mit der das Substrat interagiert. In Vernetzungs-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß die 5'-Flanke des Substrats in einer spezifischen Tasche auf der Oberfläche des Proteins gebunden wird (Niranjanakumari et al., 1998).

Demzufolge umfaßt die C-Domäne das aktive Zentrum und interagiert mit der Schnittstelle der prä-tRNA. Sie besitzt jedoch nur eine geringe Substrataffinität und Substratspezifität. Dies wird experimentell auch dadurch gestützt, daß die Proteinuntereinheit mit der C-Domäne einen katalytisch aktiven Komplex bilden kann, während die C-Domäne allein katalytisch inaktiv ist. Aufgrund der fehlenden Interaktion mit dem T-Arm kann dieser strukturell reduzierte Komplex nicht mehr zwischen kleinen *hairpin*-Substraten und vollständigen prä-tRNA-Substraten differenzieren (Loria und Pan, 2001). Die Substratspezifität des Holoenzym wird also maßgeblich über die Interaktionen zwischen der S-Domäne und dem T-Arm sowie zwischen der Proteinuntereinheit und der 5'-Flanke der prä-tRNA hergestellt. Auch scheint die Bindung der Proteinuntereinheit an die C-Domäne in direkter Nachbarschaft zu den RNA-Strukturelementen J5/15 und J18/2 (Biswas et al., 2000; Rox et al., 2002) stattzufinden, die wiederum mit Substratnukleotiden an der Spaltstelle (z. B. Nt -1) interagieren (Burgin und Pace, 1990; Kufel und Kirsebom, 1996; Christian et al., 1998; Christian und Harris, 1999; Zahler et al., 2003). In Kombination mit den Proteinkontakten im Bereich der 5'-Flankennukleotide -4 bis -8 (Niranjanakumari et al., 1998; Cray et al., 1998) kann der Schluss gezogen werden, daß sich die Spaltstelle des gebundenen Substrats an der Grenzfläche zwischen der RNA- und Protein-Untereinheit im RNase P-Holoenzym befindet. Im Gegensatz zu den Proteinkomponenten anderer Ribozyme, welche

Die RNase P katalysiert die Hydrolyse einer spezifischen Phosphodiesterbindung am 5'-Ende der prä-tRNA. Der plausibelste Katalysemechanismus ist ein S_N2 *in line*-Angriff eines externen Nukleophils auf die Phosphodiesterbindung, wobei die angreifende und die abgehende Gruppe die beiden axialen Positionen in einem trigonal-bipyramidalen Übergangszustand einnehmen (siehe Abbildung 1.3). Dabei entstehen Spaltungs-Produkte

The diagram illustrates a DNA-RNA hybrid structure. The DNA strand (top) consists of a deoxyribose sugar (labeled 'U' for Uracil) linked to a phosphate group. The phosphate group is part of a phosphorothioate modification, where a sulfur atom (S_P) is bonded to the phosphorus atom. The RNA strand (bottom) consists of a ribose sugar (labeled 'G' for Guanine) linked to a phosphate group. The phosphorus atom is also bonded to a sulfur atom (S_P). The DNA strand is labeled '5'-Flanke' and the RNA strand is labeled 'tRNA'.

8

von Metallionen mit einer höheren Affinität für Schwefel - wie z.B. den leichter polarisierbaren Mn^{2+} - oder Cd^{2+} -Ionen – teilweise wieder rückgängig gemacht werden. Ein Austausch des R_p - oder S_p -Nichtbrücken-Phosphat-Sauerstoffatoms ($\rightarrow Me_C^{2+}$ -Koordination) oder des abgehenden $3'$ -Oxyanions ($\rightarrow Me_D^{2+}$ -Koordination) an der prä-tRNA-Spaltstelle gegen ein Schwefelatom reduziert die katalytische Geschwindigkeitskonstante um das > 1000 -fache. Durch Zugabe von Mn^{2+} oder Cd^{2+} wird allerdings nur die Umsatzrate für das R_p -Phosphorothioat-Substrat wieder erhöht (Warnecke et al., 1996, 1999; Chen et al., 1997). Man kann daraus bisher nur die Schlußfolgerung ziehen, daß das R_p -Nichtbrücken-Sauerstoffatom an der Spaltstelle während der Katalyse direkt an der Metallionen-Koordinierung - beispielsweise von Me_C^{2+} in Abbildung 1.3 - beteiligt ist. Es ist weiterhin unklar, welche funktionellen Gruppen der RNase P-RNA die Geometrie des in Abbildung 1.3 gezeigten Übergangszustandes stabilisieren. Modifikations-Interferenz-Untersuchungen haben mehrere Positionen in der Helix P4 identifiziert, die katalytisch wichtige Mg^{2+} -Ionen koordinieren (Harris und Pace, 1995; Christian et al., 2000; Kazantsev und Pace, 1998).

1.3.3 Die RNase P-RNA-Untereinheit

Die RNase P-RNAs verschiedener Organismen unterscheiden sich beträchtlich bezüglich ihrer Sequenz und Länge. Allerdings gibt es einige konservierte Strukturelemente, die für die Funktionsfähigkeit des Ribozyms essentiell sind (Pace und Brown, 1995). Bei vielen RNase P-RNAs können einige Bereiche ohne vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität deletiert werden. Eine aus der Mindestzahl an phylogenetisch konservierten Elementen und Sequenzen konstruierte Minimal-RNase P-RNA (Micro P oder Min 1) oder die C-Domäne der *B. subtilis* RNase P-RNA (P-RNA) allein besitzen katalytische Restaktivität (Waugh et al., 1989; Siegel et al., 1996; Loria und Pan, 2001).

Die bakteriellen RNase P-RNAs variieren in ihrer Länge von etwa 330-450 Nukleotiden und weisen nur eine Sequenzidentität von 35-55 % auf (Brown und Pace, 1992). In den bislang bekannten 145 bakteriellen RNase P-RNA-Sequenzen sind nur 40 Nukleotide absolut invariant. Mittels phylogenetischer Kovariationsanalysen, Vernetzungsstudien und Mutationsanalysen konnte dennoch eine weitgehend konservierte Sekundärstruktur ermittelt werden, die in 18 doppelsträngige Regionen eingeteilt werden kann (Haas und Brown, 1998). Im Sekundärstrukturmodell der RNase P-RNA aus *E. coli* sind 64 % der Nukleotide basengepaart, ein Prozentsatz, der auch in anderen stabilen RNAs gefunden wird. Alle bakteriellen RNase P-RNA-Strukturen besitzen die Helices P1-5, P7-11 und P15 (Abb. 1.4). Die Helices P1, P2, P3 und P4 findet man als Kernstruktur auch in eukaryontischen und

archaebakteriellen RNase P-RNAs. In $\geq 98\%$ der bekannten bakteriellen Sequenzen sind die Helices P12 und P18 vorhanden (Haas et al., 1994; Siegel et al., 1996). Zudem konnten alle bislang untersuchten bakteriellen RNase P-RNAs zwei strukturellen Hauptklassen zugeordnet werden. Die meisten Bakterien besitzen RNase P-RNAs vom Typ A. Nur in grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt (z.B. *B. subtilis*) kommen Typ B RNAs vor.

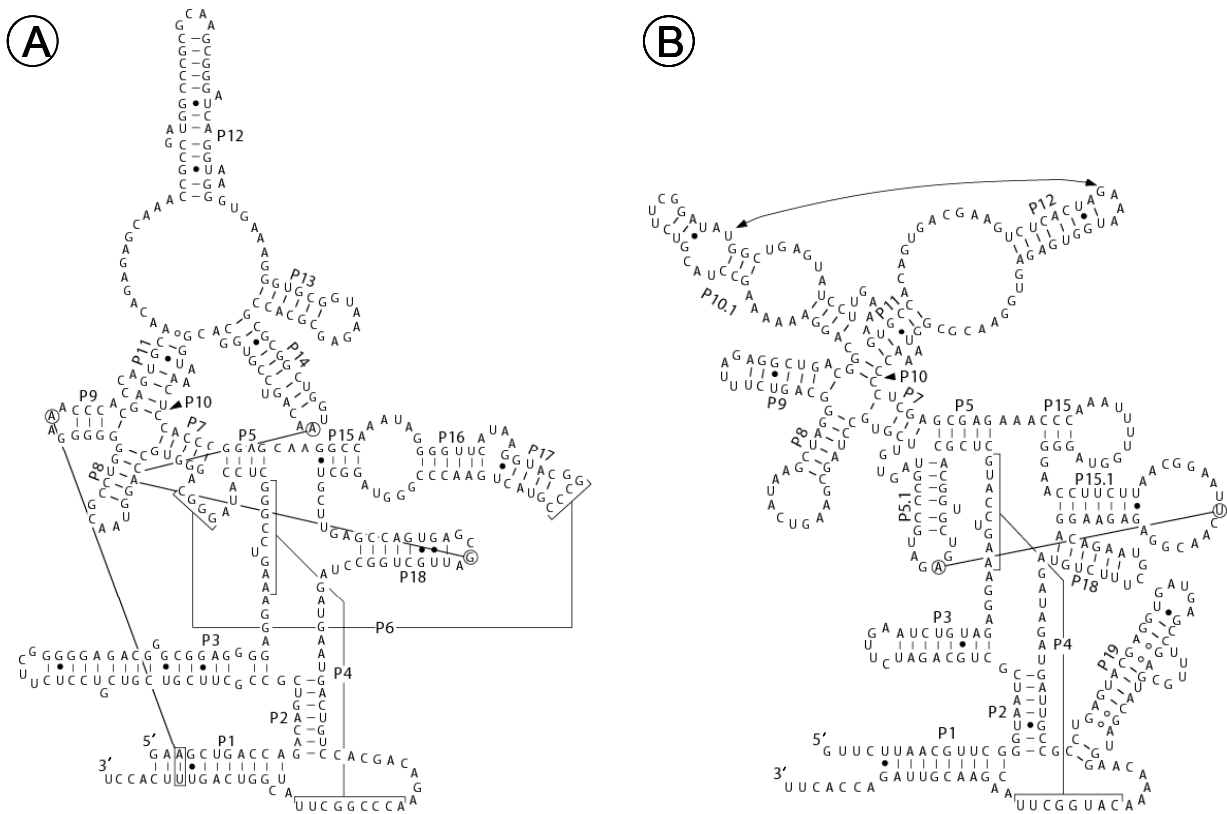


Abb. 1.4: Bakterielle RNase P-RNA-Sekundärstrukturen. Repräsentativ für das Strukturmodell Typ A bzw. Typ B sind die Sekundärstrukturen der RNase P-RNAs aus *E. coli* (A) und *B. subtilis* (B) gezeigt. Die Nummerierung der Helices (Präfix P) erfolgt vom 5'- zum 3'-Ende. Die Basenpaarungen in Helix P4 und P6 sind als Klammern und Linien dargestellt, durch Linien verbundene umrandete Nukleotide weisen auf tertiäre Wechselwirkungen hin.

Die bakteriellen RNase P-RNAs unterscheiden sich vorwiegend in den peripheren Bereichen voneinander, in denen einzelne helikale Elemente fehlen oder zusätzlich auftreten. Auch weisen Helices in den distalen Regionen häufig unterschiedliche Längen auf. Es gibt auch einige Helices im peripheren und zentralen Bereich, deren Stamm zwar eine hohe Sequenzvariabilität aufweist, deren Sequenzen aber im basalen Teil bzw. in der terminalen Schleife konserviert sind. Häufig sind diese proximalen Enden an Tertiärstruktur-Kontakten im Molekül beteiligt. Ein Beispiel hierfür – wie in Abbildung 1.4A gezeigt – sind die Helices P9, P14, P16/17 und P18 in der RNase P-RNA von *E. coli* (Haas et al., 1991;

Massire et al., 1997; Brown et al., 1996; Harris et al., 1997). Nicht für die Katalyse benötigte Strukturelemente dienen häufig der strukturellen Stabilisierung des RNA-Moleküls. Die Nukleotide in und um die Helix P4 sind die am stärksten konservierten Positionen im Molekül. Die Helix P4 liegt im katalytischen Zentrum des RNase P-Ribozyms und umfasst wichtige Metallionen-Bindestellen, wichtige funktionelle Gruppen und voraussichtlich auch Teile des aktiven Zentrums (Hardt et al., 1995, 1996; Chen und Pace, 1997; Harris und Pace, 1995; Kazantsev und Pace, 1998; Heide et al., 1999; Siew et al., 1999; Christian et al., 2000, 2002).

Wie bereits in 1.3.1 erwähnt, umfasst die bakterielle RNase P-RNA die Substrat-Bindedomäne (S-Domäne) und die katalytische Domäne (C-Domäne). Mittels NAIM (*nucleotide analog interference mapping*)-Studien konnten in der RNase P-RNA aus *B. subtilis* Regionen identifiziert werden, die voraussichtlich mit der Proteinuntereinheit interagieren (Rox et al., 2002). Die Bindung des Proteins findet demnach hauptsächlich über P10.1a und P12 der S-Domäne und P2, P3, P15.1, J18/2 und J19/4 der C-Domäne statt (siehe auch Abb. 1.4B). Die identifizierten Strukturelemente in der C-Domäne befinden sich im Enzym-Substrat-Komplex unmittelbar neben der zu spaltenden Phosphodiesterbindung. Diese Ergebnisse werden durch eine von Gopalan und Mitarbeitern publizierte Arbeit bestätigt, in der die Regionen P3, P4, J18/2 und J2/4 (entspricht J19/4 in der *B. subtilis* P-RNA) der RNase P-RNA von *E. coli* in unmittelbarer Nähe zur Proteinuntereinheit positioniert sind (Biswas et al., 2000). Bei Protektionsstudien bzw. Fe-EDTA-Spaltungsassays zur Untersuchung der Protein-RNA-Interaktionen in der RNase P von *E. coli* bzw. *B. subtilis* wurden – wie auch bei den NAIM-Studien - neben Bereichen in der C-Domäne ebenso Bereiche in der S-Domäne identifiziert (Vioque et al., 1988; Loria et al., 1998). Diese potentiellen Bindestellen schliessen allerdings einen großen Bereich der RNA ein, der mit der Größe der Proteinuntereinheit (ca 4,0 x 3,5 x 3,0 nm) nicht in Einklang steht. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß durch die Bindung des Proteins Veränderungen in der RNA-Struktur induziert werden, ohne daß das Protein selbst mit diesen Bereichen in Berührung kommt. Auch muß bei den experimentellen Ergebnissen die für das RNase P-Holoenzym aus *B. subtilis* nachgewiesene Fähigkeit zur Oligomer-Bildung berücksichtigt werden (Fang et al., 2001). Im tetrameren Komplex könnte eine Proteinuntereinheit verschiedene Regionen in den beiden RNA-Untereinheiten kontaktieren.

Auf der Grundlage vorhandener Daten aus biochemischen und biophysikalischen Studien kombiniert mit eigenen Ergebnissen aus „*footprinting*“-Analysen entwarfen Gopalan und Mitarbeiter ein dreidimensionales Modell des bakteriellen RNase P-Holoenzym in Abwesenheit und Gegenwart eines prä-tRNA-Substrats (Tsai et al., 2003; Abb. 1.5).

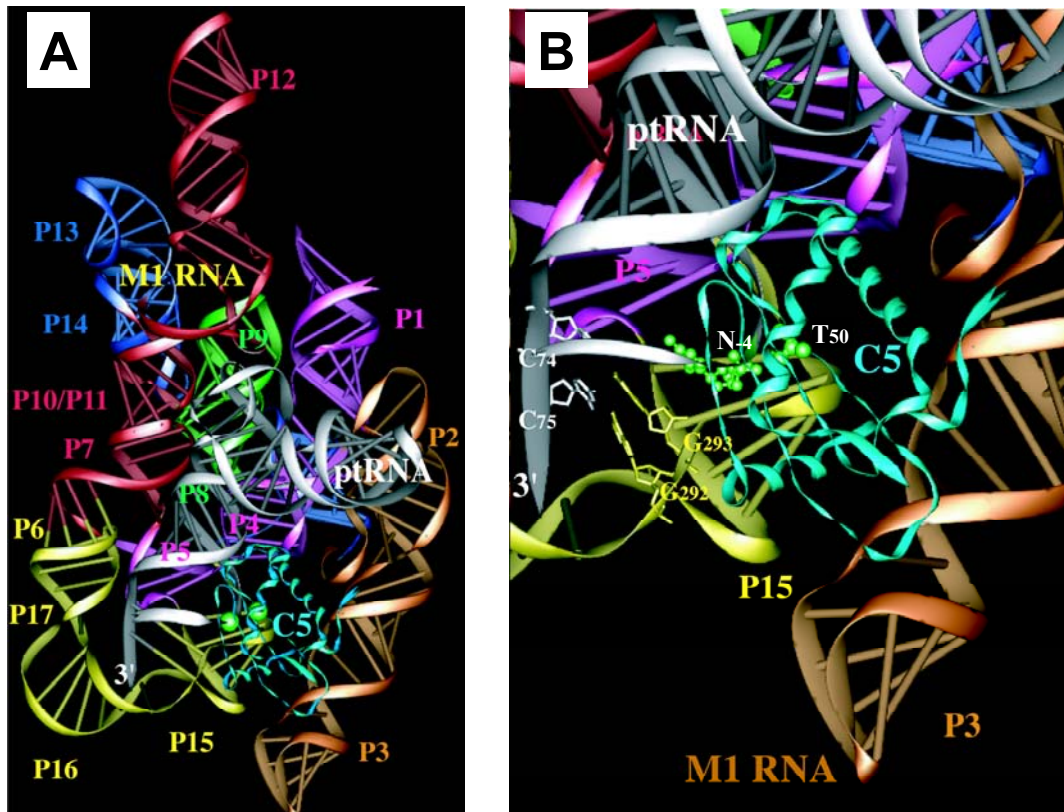


Abb. 1.5: (A) 3D-Modell des RNase P-Holoenzym-Substrat-Komplexes aus *E. coli* (Tsai et al., 2003). Die Proteinuntereinheit ist cyan und die prä-tRNA ist silber gefärbt. (B) Vergrößerter Ausschnitt aus Bild A, welcher die Basenpaarung zwischen der 3'-terminalen CCA-Sequenz der prä-tRNA und den Positionen G292 und G293 der L15/16-Schleife der RNA-Untereinheit verdeutlicht. Ebenfalls abgebildet sind die Positionen -4 der 5'-Flanke der prä-tRNA und T50 im β 3-Strang der Proteinuntereinheit (im Kugel-Stab-Format), die in unmittelbarer Nähe zueinander positioniert sind.

Die archaebakteriellen sind den bakteriellen RNase P-RNAs in Struktur und Sequenz ähnlich. Allerdings ist die in bakteriellen RNase P-RNAs stark konservierte L15/16-Schleife, die mit der 3'-terminalen NCCA-Sequenz der prä-tRNAs interagiert (siehe auch 1.3.1), in einigen archaebakteriellen RNA-Untereinheiten nicht vorhanden. Interessanterweise besitzen die meisten archaebakteriellen RNase P-RNAs, die *in vitro* eine katalytische Aktivität aufweisen, dieses Sekundärstrukturelement mit der konservierten GGU-Sequenz.

Für die eukaryontische RNase P-RNA konnte bislang kein umfassendes Sekundärstrukturmodell entworfen werden. Ausgehend von der Sekundärstruktur der nuklearen RNase P-RNA von Vertebraten, die anhand eines Alignments von 17 Sequenzen konstruiert wurde, sind in den eukaryontischen RNase P-RNA-Untereinheiten die Helices P15-P18 nicht vorhanden (Pitulle et al., 1998). Auffallend ist dafür eine große interne Ausstülpung in der Helix P3. Die P15-P18-Region fehlt auch bei anderen eukaryontischen RNase P-RNAs wie der von *Schizosaccharomyces pombe* (Chen und Pace, 1997). Dies impliziert, daß die für die Interaktion mit dem prä-tRNA-Substrat essentielle interne L15/16-Schleife generell in den eukaryontischen RNase P-RNAs nicht vorhanden ist. Die

Proteinuntereinheit(en) der eukaryontischen RNase P könnten den Verlust dieser stark konservierten Struktur kompensieren. Denkbar ist auch, daß die interne Schlaufe in Helix P3 diese Funktion übernimmt (Chen und Pace, 1997).

Die RNase P-Enzyme aus Organellen besitzen RNA-Untereinheiten, deren Strukturen in gewisser Hinsicht vergleichbar mit denen ihrer prokaryontischen Vorläufer sind. So ähnelt die Struktur der RNase P-RNA aus der photosynthetischen Organelle (Cyanelle) des Protisten *Cyanophora paradoxa* der bakterieller RNase P-RNAs, speziell jener aus Cyanobakterien (Baum et al., 1996). In Abwesenheit der Proteinuntereinheit konnte für die RNA aus *C. paradoxa* keine katalytische Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Jedoch erfolgte eine Rekonstitution der RNase P-Aktivität durch das RNase P-Protein aus dem Cyanobakterium *Synechocystis*. Diese Rekonstitution gelang nicht mit dem RNase P-Protein aus *E. coli* (Pascual und Vioque, 1999). Dies deutet darauf hin, daß die RNase P-RNAs aus Cyanellen und aus Cyanobakterien strukturell und funktionell ähnlich sind. Ein weiteres Beispiel für die strukturelle und funktionelle Verwandtschaft von RNase P-RNAs aus Organellen und aus Bakterien kann man bei den Mitochondrien aus *Reclinomonas americana* beobachten. Die Struktur der RNase P-RNA aus diesem Protisten stimmt gut mit der bakteriellen Typ A RNase P-RNA überein (Martin und Lang, 1997). Andere mitochondriale RNase P-RNAs weisen allerdings Insertionen, Deletionen und einen ungewöhnlich hohen A+T-Gehalt auf, so daß es schwierig ist, eine Konsensus-Struktur für mitochondriale RNase P-RNAs zu ermitteln (Dang und Martin, 1993; Martin und Lang, 1997).

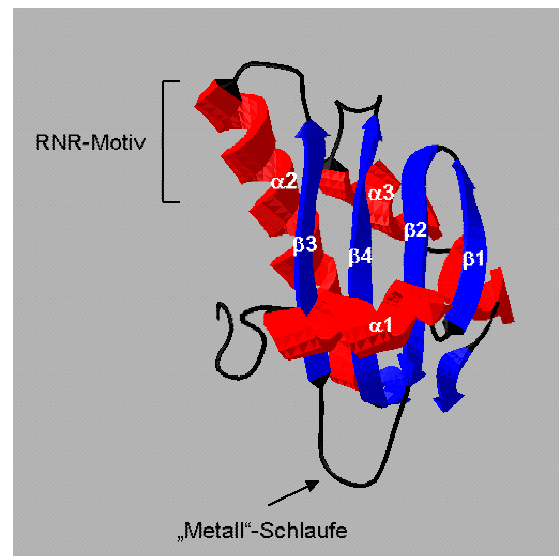
1.3.4 Die bakterielle RNase P-Protein-Untereinheit

Bei den bakteriellen RNase P-Proteinen handelt es sich - wie bereits erwähnt - um kleine basische Proteine, die etwa 120 Aminosäuren lang sind. Die Sequenzhomologie unter den bislang bekannten 112 bakteriellen RNase P-Proteinen ist sehr gering. Vergleicht man beispielsweise die Sequenzen der Proteinkomponenten von *E. coli* und *B. subtilis*, so findet man nur ca 25 % identische Aminosäuren. Das auffälligste gemeinsame Merkmal der bakteriellen RNase P-Proteinsequenzen ist ein stark konserviertes argininreiches Motiv (RNR-Motiv) im zentralen Bereich des Proteins (Stams et al., 1998). Die Funktion der *in vivo* essentiellen Proteinuntereinheit bei der RNase P Reaktion ist nicht vollständig aufgeklärt. Bislang ist bekannt, daß es die katalytisch aktive Konformation der RNA-Untereinheit stabilisiert (Talbot und Altman, 1994; Westhof et al., 1996) und die Substrataffinität erhöht (Kurz et al., 1998). Auch wird die zur Reaktion benötigte Mg^{2+} -Konzentration in Gegenwart des Proteins erniedrigt (Guerrier-Takada et al., 1983; Guerrier-Takada und Altman, 1984). Eine weitere Beobachtung war, daß die Proteinkomponente die Substratspezifität der RNase

P verändert (Kirsebom und Altman, 1989; Svärd und Kirsebom, 1993; Liu und Altman, 1994). In genetischen Komplementationstudien hatte die Mutation einzelner konservierter Positionen im RNase P-Protein nur eine geringe Auswirkung auf die Überlebensfähigkeit der Zellen - bestimmte Doppel-Mutationen hingegen waren letal (Jovanovic et al., 2002). Dies deutet auf funktionelle Redundanz und Kooperativität zwischen den einzelnen konservierten Positionen hin.

Inzwischen konnten die Tertiärstrukturen der RNase P-Proteine von *B. subtilis*, *Thermotoga maritima* und *Staphylococcus aureus* mittels Röntgenstruktur-Analyse oder NMR-Spektroskopie bestimmt werden (Stams et al., 1998; Kazantsev et al., 2003; Spitzfaden et al., 2000). Trotz der geringen Sequenzidentität sind die Strukturen dieser homologen Proteine sehr ähnlich. Die Röntgenstrukturanalyse des RNase P-Proteins von *B. subtilis* (P-Protein) zeigte, daß es sich um ein kleines globuläres Protein handelt, welches strukturhomolog zur C-terminalen Domäne des ribosomalen Proteins S5 und der Domäne IV des Elongationsfaktors EF-G ist (Stams et al., 1998). Die allgemeine Topologie ist $\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4\alpha_3$ mit einer ungewöhnlichen linksgängigen und über Kreuz verlaufenden $\beta\alpha\beta$ -Verbindung, die vermutlich eine Rolle bei der RNA-Bindung spielt (Abbildung 1.6).

Abb. 1.6: Bändermodell des RNase P-Proteins aus *B. subtilis* (mit dem Swiss-Pdb Viewer erstellt). α -Helix-Abschnitte (rot) und β -Faltblatt-Strukturen (blau) sind jeweils sequenziell vom N- zum C-Terminus nummeriert. Die potentiellen RNA-bindenden Bereiche - das RNR-Motiv und die Metall-Schleife - sind gekennzeichnet. Die zentrale Tasche, die an der Bindung der 5'-Flanke der prä-tRNA beteiligt ist, wird von der Helix α_1 und der Oberfläche des β -Faltblatts gebildet.



Auf der Grundlage der Struktur wurden drei potentielle RNA-Binderegionen des RNase P-Proteins postuliert: (1) das RNR-Motiv in Helix α_2 mit fünf exponierten basischen Seitenketten, (2) die große zentrale Tasche, die von Helix α_1 und der Fläche des β -Faltblatts gebildet wird und (3) die Aspartat- und Glutamat-reiche, Metall-Ionen-bindende Schleife zwischen den β -Strängen β_2 und β_3 („Metall“-Schleife). Das RNR-Motiv, der N-terminale Bereich und der β_3 -Strang bilden eine Oberfläche positiver Ladungen, welche in Typ A- und Typ B-Proteinen sehr ähnlich und im Holoenzym-Komplex zur RNA-Untereinheit hin orientiert ist (Sharkady und Nolan, 2001). Die auffällige Konservierung der bakteriellen RNase P-Proteine in Bezug auf Architektur und Oberflächen-Ladungsverteilung sollte erwartungsgemäß eine entsprechende Konservierung der Protein-Bindestellen in den RNA-Untereinheiten zur Folge haben. Unter den bakteriellen RNase P-

RNAs ist jedoch nur der zentrale Bereich der C-Domäne strukturell konserviert und dieser bindet nach dem aktuellen Kenntnisstand auch die Proteinuntereinheit (Pace und Brown, 1995; Biswas et al., 2000).

Die RNase P-Proteinuntereinheit hat kaum einen Einfluß auf die Faltung der RNA-Untereinheit (Loria et al., 1998; Westhof et al., 1996), so daß die Unterstützung des Faltungsvorgangs nicht die primäre Funktion des Proteins sein kann. Auch wird die Geschwindigkeitskonstante der Phosphodiestererspaltung durch die Proteinuntereinheit kaum beschleunigt (Tallsjö und Kirsebom, 1993; Kurz et al., 1998). Das RNase P-Protein stabilisiert folglich nicht direkt den Übergangszustand bei der prä-tRNA-Hydrolyse. Zahlreiche Studien haben aufgezeigt, daß die Proteinuntereinheit die Substratbindung erleichtert, indem sie mit der 5'-Flanke der prä-tRNA interagiert (Crary et al., 1998; Kurz et al., 1998). Die 5'-Flanke bindet dabei in der zentralen Tasche auf der Oberfläche des RNase P-Proteins. Dadurch wird die Affinität der RNase P für das prä-tRNA-Substrat gegenüber der für die mature tRNA erhöht. Dabei setzt das P-Protein die Dissoziationsrate der prä-tRNA herab, ohne die Assoziationsrate zu beeinflussen (Niranjanakumari et al., 1998). Demgegenüber verändert das P-Protein weder die Assoziationsrate noch die Dissoziationsrate der maturen tRNA. Eine Produktinhibition bei dem in der Zelle vorherrschenden Überschuß an maturer tRNA wird auf diese Weise verhindert. Auch unterstützt die Proteinkomponente die Funktionsfähigkeit des Enzyms unter physiologischen Bedingungen dadurch, daß es die Affinität bestimmter Mg^{2+} -Bindestellen im RNase P-prä-tRNA-Komplex erhöht (Kurz und Fierke, 2002).

2 Zielsetzung

Das Ribonuklease P (RNase P)-Enzym katalysiert die Prozessierung der 5'-Enden aller tRNAs in der Zelle. An spezifischer Position wird dabei die 5'-Flanke von dem Vorläufermolekül (prä-tRNA) endonukleolytisch abgespalten. Die bakterielle RNase P besteht aus einer etwa 350-400 Nukleotide langen, stark strukturierten RNA-Untereinheit (kodiert von *mnpB*) und einer kleinen, basischen Proteinuntereinheit von etwa 100-150 Aminosäuren Länge (kodiert von *mnpA*). Unter physiologischen Bedingungen sind in allen bislang untersuchten Bakterien beide Untereinheiten für die katalytische Aktivität essentiell. Es konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, daß die katalytische Aktivität eine Funktion der RNA-Untereinheit ist.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Konstruktion und anschließende Charakterisierung eines *Bacillus subtilis*-Stammes mit regulierbarer *mnpA*-Genexpression. Analog zu den Ergebnissen aus *E. coli* wurde erwartet, daß das vom *mnpA*-Gen kodierte RNase P-Protein in dem grampositiven Bakterium *B. subtilis* essentiell ist. Folglich sollte eine Inhibition der *mnpA*-Genexpression für die Bakterienzelle letal sein.

Mit der *B. subtilis*-Mutante waren im Anschluß homologe und heterologe Komplementationsstudien geplant. Dies sollte den konstruierten *B. subtilis*-Stamm für die strukturelle und funktionelle *in vivo*-Charakterisierung bakterieller RNase P-Proteine qualifizieren. Durch das Einfügen von Deletionen, Insertionen und Mutationen können Informationen zur Funktion einzelner Sequenzen oder Strukturelemente des RNase P-Proteins erhalten werden. Ferner sollte die Möglichkeit geschaffen werden, sämtliche für *in vitro*-Experimente konzipierte Mutanten des RNase P-Proteins aus *B. subtilis* auf ihre *in vivo*-Funktion hin zu evaluieren. Das Ziel der heterologen Komplementationsanalysen war, strukturelle Verwandtschaften zwischen bakteriellen RNase P-Proteinen – die untereinander nur eine geringe Sequenzhomologie aufweisen – anhand ihrer Funktionalität in der *B. subtilis*-Mutante nachzuweisen. Auch zeigen einige bakterielle RNase P-Proteine unterschiedlicher Bakteriengattungen stärkere Abweichungen bezüglich ihrer Sequenz und Länge. Die RNase P-Proteine dieser Bakterienspezies können ebenfalls in der *B. subtilis*-Mutante untersucht werden, um die funktionelle Bedeutung derartiger Unterschiede aufzuklären.

Im Verlauf der Arbeit wurde eine weitere Anwendung der *B. subtilis*-Mutante konzipiert. So sollte das konstruierte Zellsystem die Überexpression der beiden RNase P-Untereinheiten und anschließend die einfache Aufreinigung von *in vivo* rekonstituiertem RNase P-Holoenzym mittels eines Oligo-Histidin-Ankers des RNase P-Proteins ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP:	Amersham, Freiburg; ICN Radiochemicals, Irvine, CA (USA)
β -Mercaptoethanol:	Serva, Heidelberg
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (29/1):	BioRad, München
Acrylamid:	Serva, Heidelberg
Agar-Agar:	Difco; Life Technologies
Agarose:	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Ammoniumacetat:	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS):	Merck, Darmstadt
Ampicillin:	Sigma, Deisenhofen
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP):	Promega, Mannheim
Bromphenolblau (BPB):	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid:	Merck, Darmstadt
Chloroform:	Merck, Darmstadt
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R250:	Serva, Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs):	Boehringer, Mannheim
Dithiothreitol (DTT):	Gerbu, Gaißberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA):	Merck, Darmstadt
Eisessig:	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.:	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid:	Serva, Heidelberg
Formamid:	Sigma, Deisenhofen
Glukose:	Merck, Darmstadt
Glycerin:	Merck, Darmstadt
Größenstandards (für Proteine & DNA):	Gibco BRL, Eggenstein
Harnstoff:	Merck, Darmstadt

HEPES:	BioMol, Hamburg
Isobutanol:	Merck, Darmstadt
Isopropanol:	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl):	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver:	Merck, Darmstadt
Magnesiumacetat:	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumacetat:	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumchlorid (NaCl):	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH):	Fluka, Buchs (Schweiz)
Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT):	Promega, Mannheim
N,N'-Methylenbisacrylamid:	Fluka, Buchs (Schweiz)
Phenol:	Roth, Karlsruhe
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1):	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S:	Serva, Heidelberg
PIPES:	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA):	Serva, Heidelberg
Rotiphorese 30 (Acrylamid-/Bisacrylamid-Lsg.):	Roth, Karlsruhe
Select Peptone 140:	Gibco BRL, Eggenstein
Select Yeast Extract:	Gibco BRL, Eggenstein
Tetramethylethylendiamin (TEMED):	Fluka, Buchs (Schweiz)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris):	Serva, Heidelberg
Triton X-100:	Serva, Heidelberg
Trizol®Reagenz:	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanolblau (XCB):	Eastman Kodak, Stuttgart

Alle hier nicht gesondert aufgelisteten Chemikalien sind von den Firmen Amersham Buchler (Braunschweig), Becton Dickinson (MA, USA), BIO101 (Carlsbad, USA), Boehringer Mannheim GmbH/Roche (Mannheim), Clontech Laboratories (Palo Alto, USA), Fluchs (Buchs, Schweiz), Gerbu (Gaiberg), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), Life Technologies (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Stratagene (Heidelberg) und besitzen, wenn nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad 'pro analysis' (p.a.).

3.1.2 Geräte

Agarosegel-Kammer	Mini-Sub®Cell Gt/Wide-Sub®Cell Gt (BioRad, München)
Autoklaven	3870 ELV (Tuttnauer, Breda, Niederlande); Dampfsterilisator Varioklav Typ 400 (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim)
Bioimager	FLA-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)
Blot-Apparaturen	Vacu Gene™XL Vacuum Blotting System (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Sammy Dry (Schleicher & Schuell, Dassel)
Brutschränke	Typ B12/B 6120/B 5060 E (Heraeus Instruments, Langenselbold)
Dewargefäße	(KGW Isotherm, Karlsruhe)
Dokumentationsanlage	Vario Cam/UV-Tisch 312 nm (Phase, Lübeck); Video Graphic Printer UP-890CE (Sony, Köln)
Elektroporator	Gene Pulser II/Pulse Controller Plus/Capacitance Extender Plus (BioRad, München)
Eismaschine	Typ 125-75 (Ziegra, Isernhagen)
Geltrockner	Membran Vakuum-Pumpe (Vacuubrand GmbH, Wertheim); Phero-Temp (Biotech-Fischer, Reiskirchen)
Heizblöcke	Bioblock Scientific (Thermolyne, Dubuque, IA, USA) Thermostat 5320 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf); HB-130 (Unitek, Vaterstetten)
Heizschrank	T 5050 (Heraeus, Langenselbold)
Hybridisierungsöfen	OV3 (Biometra, Göttingen)
Inkubatoren	T 5042 EK (Heraeus, Langenselbold)
Kulturschüttler	HT (Infors AG, Bottmingen, Schweiz); Thermoshake (Gerhardt, Königswinter); Typ 3033 (GFL, Burgwedel)
Magnetrührer	IKA-Combimag RET (Janke & Kunkel, Staufen)
Mikrowelle	SS-578H (Siemens, München)
Netzgeräte	Power Pac 300 (BioRad, München); Power-Supply-EPS 600 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
PAA-Gelkammer	Mini Protean II (BioRad, München); Multigel (Biometra, Göttingen); Eigenbau (Wissenschaftliche Werkstätten, Uni Lübeck)
PCR-Gerät	Cycler Biometra® UNO II/Personal Cycler (Biometra,

	Göttingen)
pH-Meter	pH538, Elektrode: WTW, SenTix 97 T (WTW, Weilheim)
Photometer	Spektrophotometer DU®640 (Beckman, Fullerton, CA, USA)
Pipetten	P2, P20, P200 und P1000 (Gilson, Den Haag, Niederlande); Research® (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Reinstwasseranlage	Milli-Q® biocell (Millipore, Schwalbach)
Röntgenfilmentwicklung	Cronex T5A (Du Pont, Du Pont de Nemours, Frankreich)
Röntgenfilmkassetten	Riegelschlusskassetten (Rego, Augsburg)
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR (Janke & Kunkel, Staufen); Celloshaker Variospeed (Renner GmbH, Güglingen)
Scanner	SnapScan 1212 P (Agfa, Köln); Epson Perfection 1670 (Epson, Meerbusch)
Sterilbänke	Antair BSK4 (Baker Company, Stanford); HeraSafe (Heraeus, Langenselbold)
Szintillationszähler	LS 6000 (Beckman, Fullerton, CA, USA)
Thermoschüttler	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Tischzentrifugen	Kühlzentrifuge Microfuge®R (Beckman, Fullerton, CA, USA); Biofuge 13/15R (Heraeus, Langenselbold)
Ultraschallbad	Sonorex RK102H (Bandelin, Berlin)
Ultraschallstab	Sonicator Sonoplus GM70 mit UW70/SH70G (Bandelin; Berlin)
UV-Transilluminator	Chromato-VUE TS-15 (Ultra Violet Products Inc., Upland, CA, USA)
Vakuumkonzentrator	Speed Vac®Plus SC110A/Refrigerated Vapor Trap RVT 100 (Savant, Holbrook, NY, USA) mit Ölpumpe (G. Bauknecht AG, Schorndorf)
Vortexer	IKA-Vibrofix VF1 Electronic (Janke & Kunkel, Staufen)
Waagen	SBA41 (Scaltec, Göttingen); L2200S/2354/2024 MP (Sartorius, Göttingen)
Wasserbäder	PD Industriegesellschaft; Julabo Exatherm U3 Electronic (GFL, Burgwedel); G/D8 (Haake, Karlsruhe)
Zentrifugen	Ultrazentrifuge L-70 mit 50 Ti-Rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA); Rotixa 120 R (Hettich, Tuttlingen); Avanti™ J-25 mit Rotor JLA10.500 oder JLA-25.50 (Beckman, Fullerton, CA, USA)

3.1.3 Sonstige Hilfsmittel

Elektroporationsküvetten (0,1 cm/0,2 cm/0,4 cm)	BioRad, München
Filtereinheit, 0,2 µm (Filtropur)	Sarstedt, Nürnberg
Filterpapier GB03/GB04	Schleicher & Schüll, Dassel
Halb-Mikro-Küvette, PS (OD-Bestimmung)	Sarstedt, Nürnberg
Hyperfilm™-ECL™	Amersham, Braunschweig
NAP-Säulen (Sephadex G-10/G-50)	Pharmacia, Uppsala, (Schweden)
Nick™-Säulen (Sephadex G-50)	Amersham, Braunschweig
Nylon-Blotmembran (Hybond N)	Amersham, Braunschweig
PD-10 Säulen (für die Entsalzung)	Amersham, Braunschweig
Petrischale 92 X 16 mm (ohne Nock)	Sarstedt, Nürnberg
PVDF-Blotmembran (Immobilon P)	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäß 0,5 ml; PP	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäß 1,5 ml <i>safety caps</i> , PP	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäß 2,0 ml <i>safe-seal</i> , PP	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäß 13 ml (steril) 100 X 16 mm, PP	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäß 15 ml 120 X 17 mm, PP	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäß 50 ml 114 X 28 mm, PP	Sarstedt, Nürnberg
Röntgenfilme Fuji Film RX	Fuji, Tokyo, Japan
Säulen für die DNA-Präparation	Macherey-Nagel, Düren; Qiagen, Hilden
Säulen für die RNA-Präparation	Qiagen, Hilden
Suprasil®Präzisions-Quarz-Küvetten	Hellma®, Mühlheim
Ultrafree®-MC (DNA-Extraktion aus Agarose-Gel)	Millipore, Schwalbach

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primärantikörper

Anti- <i>B. subtilis</i> RnpA-Antiserum aus Kaninchen (P.ab syra 6)	C. A. Fierke, University of Michigan, U.S.A.
Anti- <i>E. coli</i> RnpA-Antiserum aus Kaninchen	A. Vioque, University of Sevilla, Spain (Pascual und Vioque, 1996)
Anti- <i>Synechocystis</i> RnpA-Antiserum aus Kaninchen	A. Vioque, University of Sevilla, Spain (Pascual und Vioque, 1996)
Anti-Penta•His™ IgG1 aus Maus (monoklonal)	Qiagen, Hilden

3.1.4.2 Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen IgG aus Ziege (affinitätsgereinigt), gekoppelt an Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Anti-Maus IgG aus Ziege (affinitätsgereinigt), gekoppelt an Peroxidase	Dianova, Hamburg

3.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
AMV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
DNase I, RNase-frei	Promega, Mannheim
Lysozym	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Roche, Mannheim
<i>Pwo</i> -Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Roche, Mannheim
RNase A	Sigma, Deisenhofen

T4 DNA-Ligase	Gibco BRL, Eggenstein
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas, St Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Tfl</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

3.1.6 Synthetische DNA-Oligonukleotide für die PCR und Detektion

Die Sequenzen der DNA-Oligonukleotide sind jeweils von 5' nach 3' angegeben. Relevante Restriktionsenzym-Schnittstellen sind kursiv und durch den *Primer* mutierte Nukleotide bzw. angefügte Sequenzen sind fett gedruckt.

Primer- Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Erkennungs- sequenzen
5-N-His_ <i>mpA</i>	CGGATATCTAG ACTATGAGAGGATCGCATCACCATC	EcoR V, Xba I
3-N-His_ <i>mpA</i>	GTACATGCATGCGG TACCGAGCTCCTAGTTTGACGA	Sph I, Kpn I
5-pSynC5	ACGCGTCGACATGGGACTACCCAAAACAC	Sal I
3-pSynC5	ACATGCATGCTCATAATAAGTGGTTTCTCG	Sph I
5'-Bs <i>mpB</i>	AAATCTAAAATTCCTGAAAAATTTTGC	
3'-Bs <i>mpB</i>	AAATTCTTTTCAAGATAAAAGCTCTCC	
<i>cam</i> -Stu	AATTGTCAGAT TGGCC AAATGACTGGC	Bal I
<i>cam</i> -Pst	AAACTGCAGGAATTCGA AGGCC ACGATG	PstI
<i>cam</i> -5	GCCAGTCATTTGGCCTATCTGACA	
<i>cam</i> -3	ACTGGTTACAATAGCGACGGAGAG	
<i>dnaA</i> -5	CTTGCGGTTTCGGCATAAAGTCCTCAAC	
<i>jag</i> -3	CGGAATTCGTCACATCAGACTTCCCGGCAATGG	EcoR I
kom-duo-5	CCCAAGCTTAAGGAGGAAATAACATGAACATTCCAA	Hind III
kom-solo-5	GCTCTAGAGGAGTGAGTCATTTGAAGAAGCGAAATCGTT	Xba I
kom-3	GCTCTAGAGGTACCTCCTATAATTAATCTTTACACTCTTTTA	Xba I
<i>linker</i> -Stu	GAAAGGCCTGCCGAATCAAACGTTTG	Stu I
<i>linker</i> -solo	CCGCCGATTTAAATAACATGAGTCATTTGAAGAAGCGAAAT CG	Swa I
<i>linker</i> -duo	CCGCCGATTTAAATAACATGAAAAGAACATTCCAACCGAAT AAC	Swa I

nativKompl-5'	GGAATTCGAGCTCCTATAATTAATCTTTACACTC	
nKomp-3'	CGCGGATCCTATTATGGTTGCAAGAAATAAAAGC	
nKomp-5'	CGGAATTCAAGCTTTACACTCTTTTATTGCAAAGC	
pDG-F	TCCAGACTATTCGGCACTGA	
pDG-R	TGTTGATGGGTGTCTGGTCA	
pDGseq	GTGTGGCATAATGTGTGGAATTG	
pQE-C5-5'	CTAGTCTAGAGATCCATGGTTAAGCTCGCATTTTC	
pQE-C5-3'	ACGCGTCGACTCTCGCCAAGCTAGCTTGGAT	
p3d-His1-3	ATGATGGTGATGATGATG CTTTGACGAAGATTTCTTATATA ATG	
p3d-His2-3	CGGGGTACCCTAATGGTGATGATGGTGATGATGATG CTTT GACG	Kpn I
p3stop5' out	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAAGGAGG	Hind III
p3stop5' in	GGGACAT G AGTTGCAAACCGCTAGTTTGTCTTATATAC	
p3stop3' in	GACAAACT A GCGGTTTGCAACT C ATGTCCCATGTTTAAAC	
p3stop3' out	AAGAAAGGCCTGCCGAATCAAACGTTTGATCCG	Stu I
<i>rnpA</i> -3	ATATGTCAGCTGGCTCGCCGGTT	
<i>rnpA</i> -sonde	TACGCTTGATCAGCCTGAAAATGATGAACTGCGTGTCGGG CTTTCCGTCA	
<i>rpmH</i> -5	CCAACCGAATAACCGTAAACGCAG	
<i>rpsR</i> -F	GCAGAGGCGGTCGTGCGAAA	
<i>rpsR</i> -R	ACGTGCGCGTTTGATCGCTGCA	
RT1-duoC5	TCATATGTCAGCTGGCTCGCC	
RT2-duoC5	GTGAGTCATTTGAAGAAGCGAAATCGT	
RT3-duoC5	ATCAGTTGCAAACCGCCAGT	
RT4-duoC5	CGCCGGTTTTCTGGCAATA	
RT1- <i>coli</i> C5	GAGAGCACGGTTATCGAGGTC	
RT2- <i>coli</i> C5	TGGTTAAGCTCGCATTTCCCAGG	
RT1- <i>syn</i> C5	GGAAAGCGACATCGTCACAG	
RT2- <i>syn</i> C5	GGTTTCTCGAATGCCCATGG	
<i>spolIJ</i> -3	CTTTCACACTCGAGCATCCAGCC	
<i>xyl</i> -Stu-3	CGCCGCTCGAGAGGCCCTCCTTAAAAATAAATTCAAATACA G	XhoI, StuI
<i>xyl</i> -Eco-5	GACAAAGGTTTGATCTGCGATATCC	EcoR V
<i>xylR</i> -go-5	GCCTAGGATGAAGTGGATATCGCAGATC	Avr II
<i>xylR</i> -nd-3	ACGCGTCGACGTAAATATTCCTTCATAAAATTATCC	Sal I

3.1.7 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>B. subtilis</i> YB886	<i>trpC2 metB10 SPβ⁻ (Ery^r)</i>	Yasbin et al., 1980
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook et al., 1989
<i>E. coli</i> DM1	<i>F⁻dam⁻13::Tn9(Cm^r)dcm⁻mcr BhsdR⁻M⁺ gal1 gal2 ara⁻ lac⁻thr⁻ leu⁻ ton^R tsx^R su^o λ⁻</i>	Gibco BRL
<i>E. coli</i> XL-2 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proA+B+ lacIqΔM15 Tn10 (tetR) Amy Camr]q</i>	Stratagene
Top10 One Shot TM	<i>F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80/lacZΔM15 ΔlacX74deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen

3.1.8 Verwendete Plasmidvektoren

Vektor	relevanter Genotyp	Referenz
pBluescript IIS(+)	<i>lacP-lacZα Ap^r ColE1 ori</i>	Stratagene
pDG148	<i>pBR322-pUB110 Kan^R lacI P_{spac}</i>	Stragier et al., 1988
pHY300PLK	<i>Tc^R ori α1 Ap^R ori177</i>	Takara Biomedicals
pIW11	YRP7 mit 5,8-kBp chromosomaler DNA von <i>B. subtilis</i> W23 (<i>Ap^r xylR xylA xylB</i>)	Wilhelm und Hollenberg, 1984, 1985
pSP64	<i>ori pMB1 Ap^R</i>	Promega
pUC18	<i>rep ori Ap^R lacP-lacZ</i>	Life Technologies
pWH418	<i>Ap^r Cm^r spoVG-lacZ xylA_p</i>	Gärtner et al., 1988

3.1.9 Verzeichnis verwendeter Medien und Puffer

Anodenpuffer.....	56
Blockierlösung.....	59
Denaturierungslösung.....	47
Denhardt's Lösung.....	48
DNA-Probenpuffer.....	32
DTY-Medium.....	27
Ethidiumbromidfärbelösung.....	32
Färbe-/Entfärbelösung.....	57
Hybridisierungslösung.....	48
Kathodenpuffer.....	56
LB-Medium.....	27
LBSP-Medium.....	30
LBSPG-Medium.....	30
Lösung A/B/C.....	40
Lysepuffer.....	50
Phenol, sauer.....	51
Protein-Probenpuffer.....	56
Reaktionspuffer.....	64
RNA-Probenpuffer.....	33
Schäggergelpuffer.....	55
SHMG-Medium.....	30
SOC-Medium.....	28
Substratpuffer.....	60
TAE-Puffer.....	32
TBE-Puffer.....	33
TBS-Puffer.....	59
TE-Puffer.....	35
TFB I/III-Lösung.....	28
Transferpuffer (<i>Southern Blot</i>).....	47
Transferpuffer (<i>Western Blot</i>).....	58
TSE-Puffer.....	40
TUS-Puffer.....	54
Waschpuffer (Immundetektion).....	60
Waschpuffer (Aktivitäts-Assay).....	65

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterielle Zellkultur

3.2.1.1 Sterilisation

Alle Medien und Puffer wurden 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert und Glaswaren für mindestens 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert.

3.2.1.2 Zellaufzucht in Flüssigmedium

LB-(Luria-Bertani-)Medium:	10 g/l Pepton 140 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl der pH wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt
DTY-(Double Yeast Tryptone) Medium:	16 g/l Pepton 140 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl

Für die Aufzucht von *Escherichia coli*-Stämmen wurde autoklaviertes LB-Medium verwendet. Die *Bacillus subtilis*-Stämme wurden in den autoklavierten Vollmedien LB bzw. DTY angezüchtet. Bei Bedarf (im Text angegeben) wurde dem Medium zur Selektion das Kohlenhydrat Xylose (Xyl, 2 % (w/v)) oder Glukose (Glu, 2 % (w/v)) bzw. die Antibiotika Chloramphenicol (cam, 5 µg/ml), Kanamycin (kan, 20 µg/ml) und/oder Ampicillin (amp, 100 µg/ml) zugegeben.

Übernachtskulturen für analytische Zwecke bzw. Vorkulturen (jeweils 4 ml Flüssigmedium im Kulturröhrchen) wurden entweder aus Glycerinkulturen oder mit auf Agarplatten isolierten Einzelkolonien angeimpft. Diese wurden bei 37 °C unter starkem Schütteln (160-250 rpm) in Kulturschüttlern (HT; Infors AG oder Typ 3033; GFL) inkubiert. Für präparative Aufzuchten wurde ein größeres Volumen Flüssigmedium im Erlenmeyerkolben mit Schikane (20% des Nennvolumens mit Medium gefüllt) mit der Vorkultur inokuliert und bis zur gewünschten Zelldichte bei 37 °C geschüttelt. Das Volumen des Inokulums betrug $1/_{20}$ bis $1/_{50}$ der

Vorkultur. Falls erforderlich, wurde die optische Dichte der Bakterienkultur mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bzw. 600 nm gemessen (\equiv OD₅₇₈-Wert bzw. OD₆₀₀-Wert).

Zur Herstellung der mehrere Jahre haltbaren Glycerinkulturen wurden 500 µl Zellkultur mit 500 µl autoklaviertem Glycerin (~87 %) gründlich gemischt und dann bei -80 °C zur Lagerung eingefroren. Die *B. subtilis*-Kulturen wurden hierzu - im Gegensatz zu den *E. coli*-Kulturen - nicht mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.1.3 Zellaufzucht auf Agarplatten

Zur Bereitung fester Nährböden wurde dem jeweiligen Medium 15 g/l Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren (3.2.1.1) wurde die Lösung im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt und die für die Selektion erforderlichen Kohlenhydrate bzw. Antibiotika hinzugefügt. Das flüssige Medium wurde dann in sterile Petrischalen aliquotiert (12 ml für Schalen von Ø 9 cm). Mit der Agarseite nach oben konnten die Platten dann bei 4 °C für maximal 3 Monate gelagert werden.

Um einzelne Zellkolonien zu erhalten wurden 10-100 µl einer 1:10³ bis 1:10⁵-verdünnten Übernachtskultur auf die Agarplatte pipettiert und mit einem sterilen Glasspatel bzw. einer ausgeglühten Impföse gleichmässig ausgestrichen. Die Oberfläche der Platten wurde kurz bei RT angetrocknet und dann mit der Agarseite nach oben im Brutschrank bei 37 °C (*B. subtilis*-Kulturen im Ausnahmefall auch bei 30 °C) über Nacht inkubiert.

3.2.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Das Einschleusen von freier, löslicher DNA in Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden zum Einbringen autonom replizierender, zirkulärer Plasmide angewendet. Bei *E. coli*-Zellen wurde die DNA-Aufnahmebereitschaft durch eine Vorbehandlung der Zellen induziert, bei *B. subtilis*-Zellen wurde isolierte Plasmid-DNA experimentell durch Elektroporation eingebracht. Als Selektionsmarker dienten plasmidkodierte Antibiotika-Resistenzen.

Transformation von *E. coli*-Zellen

Die bei –80 °C gelagerten kompetenten DH5α-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 50 µl der kompetenten Zellen wurden zu 5 µl eines Ligationsansatzes bzw. einer verdünnten Plasmidlösung (≈100 ng/ml) gegeben und 30 min im Eisbad inkubiert. Danach wurden die Zellen einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt (42 °C, 45 s). Nach 2 min Abkühlung auf Eis wurden 300 µl SOC-Medium dazupipettiert und die Zellen 60 min bei 37 °C in einem Thermomixer bei 200-300 rpm inkubiert. Abschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.2 Transformation von *B. subtilis*-Zellen

LBSP-Medium (pro l):	10,0 g Pepton 140 5,0 g Hefeextrakt 5,0 g NaCl 85,6 g Sucrose 6,8 g KH ₂ PO ₄ 8,7 g K ₂ HPO ₄ der pH wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt
SHMG-Puffer (pro l):	85,6 g Sucrose 0,2 g HEPES 0,2 g MgCl ₂ 115 ml 87 % Glycerin der pH wurde mit HCl auf 7,2 eingestellt
LBSPG-Medium:	LBSP-Medium mit 10 % (v/v) Glycerin

Herstellung elektro-kompetenter *B. subtilis*-Zellen

Das für die Elektrotransformation von *B. subtilis*-Zellen verwendete Protokoll basiert auf der von Vehmaanperä entwickelten Methode (Vehmaanperä, 1989). Bei dieser Methode wurde besonderer Wert auf die Stabilisierung der elektrotransformierten *Bacillus*-Zellen durch die verwendeten Medien und Puffer gelegt.

4 ml LBSP-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *B. subtilis* inokuliert und über Nacht bei 180 rpm und 37 °C geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 50 ml vorgewärmtes LBSP-Medium angeimpft und bei 180 rpm und 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Mit jeweils 10 ml dieser Kultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, wurden daraufhin erneut 4 x 200 ml LBSP-Medium angeimpft und weiterhin bei 180 rpm und 37 °C geschüttelt. Bei Erreichen einer $OD_{600} \approx 1,0$ wurden die Kulturen für 10 min in ein Eisbad gestellt. In einem vorgekühlten Rotor (JLA 10.500 von Beckman) wurden die Zellen dann bei 10.000 x g für 7 min bei 4 °C pelletiert. Es folgten 3 Waschschritte mit insgesamt 600 ml eiskaltem SHMG-Puffer. Das Pelletieren der Zellen erfolgte jeweils entsprechend den oben genannten Parametern. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in ca. 8 ml eiskaltem SHMG-Puffer resuspendiert ($\approx 3\text{-}5 \times 10^{10}$ Zellen/ml) und in 0,5 ml-Aliquots aufgeteilt. Diese wurden bei –80 °C eingefroren (nicht mittels flüssigem Stickstoff). Die Zellen blieben auf diese Weise mehrere Monate transformierbar.

Elektrotransformation von *B. subtilis*-Zellen

Bei der Elektroporation werden die Bakterienzellen für Millisekunden einer hohen elektrischen Spannung ausgesetzt. Das starke elektrische Feld erzeugt transient Poren in der Zellmembran, durch welche Makromoleküle in die Zelle diffundieren können.

Die Elektrotransformation wurde mit dem Pulsgenerator von BioRad durchgeführt. Dieser war zusammengesetzt aus dem Gene-Pulser (Gene Pulser II), dem Pulse-Controller und der Probenkammer. Nach dem Aufladen mit dem Gene-Pulser liefert der Kondensator bei der Entladung einen exponentiell abfallenden Spannungsimpuls. Es stehen insgesamt vier verschiedene Kondensatoren zur Verfügung, die mit Spannungen bis zu 2,5 kV aufgeladen werden können. An den Gene-Pulser ist der Pulse-Controller angeschlossen, der durch das Zuschalten verschiedener Parallelwiderstände zur Probenkammer eine Steuerung der angelegten Pulse in Bezug auf die Zeitkonstante erlaubt. Als Zeitkonstante wird jene Zeit bezeichnet, die der Puls benötigt, um auf $1/e$ ($\approx 37\%$) seiner Ausgangsspannung abzufallen. Die Pulszeit ist abhängig von der Aufladespannung des Kondensators, von der Kapazität des Kondensators sowie vom elektrischen Widerstand des Zell-/DNA-Gemisches. Um Kurzschlüsse in der mit Zellsuspension gefüllten Elektroporationsküvette zu vermeiden, darf der Puffer, in dem die Zellen resuspendiert sind, keine zu hohe Leitfähigkeit (hohe Salzkonzentration) besitzen. Ebenfalls sollte die zur Transformation verwendete Plasmid-DNA einen hohen Reinheitsgrad aufweisen.

Die 0,5 ml-Aliquots der eingefrorenen Zellen wurden schnell in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut und durch kurzes Vortexen mit 1-6 µg der Plasmid-DNA gemischt. Die Zellen wurden dann in vorgekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvetten überführt und für 20 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde mit dem Elektroporator ein einzelner Strompuls verabreicht (1,6-2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Unmittelbar darauf wurde die Zellsuspension 1 : 10 in LBSPG-Medium bei RT verdünnt und im Thermoschüttler für 90 min bei 37 °C mit 180 rpm zur Expression der Antibiotika-Resistenzmarker inkubiert. Nach dem Pelletieren der Zellen für 5 min bei 5.000 x g und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 600 µl LB-Medium resuspendiert. Hiervon wurden jeweils 100 µl auf Selektionsplatten ausgestrichen. Von den restlichen, nicht ausplattierten Zellen wurde eine Glycerinkultur angelegt.

3.2.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken

3.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x konz.):	2 M Tris/HAc pH 8,3 50 mM EDTA 5,71 % (v/v) Eisessig
DNA-Probenpuffer (6x konz.):	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 25 % (w/v) Ficoll 400 in 1 x TAE-Puffer; pH ≈ 8,5
Ethidiumbromid-Färbelösung:	10 mg/ml in 1x TAE-Puffer

Mit dem Begriff Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele verwendet. Agarose ist ein galaktosehaltiges Polysaccharid, welches durch Aufkochen im entsprechenden Puffer gelöst wird und beim Abkühlen (unterhalb von 38 °C) zu einem großporigen Gel erstarrt. In der Gelmatrix wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren dann von verschiedenen Parametern bestimmt. Neben der Stromstärke, den Pufferbedingungen und der Agarosekonzentration sind dies insbesondere die Größe und Konformation der DNA. Bei linearen,

doppelsträngigen DNA-Fragmenten ist das Verhältnis von Ladung zu Masse konstant und die Laufstrecke ist innerhalb eines bestimmten Bereichs (< 5 - 8 kb) umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Fragmentlängen-Trennbereiche sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Fragmentlänge	Agarosekonzentration (w/v)		Bromphenolblau	Xylencyanol
1,0 bis 30 kb	0,5 %		1,0 kb	10,0 kb
0,8 bis 12 kb	0,7 %		0,7 kb	6,0 kb
0,5 bis 7 kb	1,0 %		0,3 kb	3,0 kb
0,4 bis 6 kb	1,2 %		0,2 kb	1,5 kb
0,2 bis 3 kb	1,5 %		0,12 kb	1,0 kb
0,1 bis 2 kb	2,0 %		< 0,1 kb	0,8 kb

Tab. 3.1: Trennbereich von Agarosegelen in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration. Zusätzlich angegeben sind Längen der Fragmente, die mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylencyanol komigrieren.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgenommen (siehe Tab. 3.1) und in der Mikrowelle aufgekocht, bis beim Schwenken keine Schlieren mehr sichtbar waren. Für analytische Gele wurde die Lösung mit Ethidiumbromid-Färbelösung versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen "Elektrophoreseschlitten" gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Flachgelkammer bei 60 - 120 mA durchgeführt. Die Proben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen DNA-Probenpuffer gemischt. Zur Ermittlung der Größe der DNA-Fragmente in den Proben wurden parallel kommerziell erhältliche Größenstandards auf das Gel aufgetragen. Unter langwelligem UV-Licht (306 nm) fluoreszieren die Nukleinsäuren durch interkalierte Ethidiumbromidionen als leuchtend orangene Banden.

3.2.3.2 Denaturierende Polyacrylamid-Geleelektrophorese (PAGE)

TBE-Puffer (10x konz.)

890 mM Tris

890 mM Borsäure

20 mM EDTA

pH ~ 8,3

RNA-Probenpuffer (2x konz.): 2,6 M Harnstoff
 66 % (v/v) Formamid
 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
 0,02 % (w/v) Xylencyanol
 in 2x TBE

Hier entsteht die Gelmatrix durch eine radikalische Polymerisationsreaktion von Acrylamid-Monomeren und N,N'-Methylenbisacrylamid, die durch TEMED katalysiert und durch APS gestartet wird. Der Grad der Quervernetzung der linearen Acrylamid-Polymere wird durch die Menge des in geringerer Konzentration vorliegenden Bisacrylamids bestimmt. Die standardmäßig verwendete Stammlösung setzte sich aus 48 % Acrylamid und 2 % Bisacrylamid in H₂O_{bidest} zusammen.

Für die Größenbestimmung einzelsträngiger Nukleinsäuren verwendet man denaturierende Gele mit 7 bis 8 M Harnstoff, welcher die zur Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen benötigten Wechselwirkungen der Moleküle unterbindet. Damit die Proben bereits beim Einlaufen in die Gelmatrix im denaturierten Zustand vorliegen, enthält auch der Probenpuffer Harnstoff sowie Formamid, welches ebenfalls denaturierende Eigenschaften besitzt. Im Rahmen dieser Arbeit war zum Nachweis der RNase P-spezifischen Spaltungsaktivität die Auftrennung von prä-tRNA und deren 5'-Flanke notwendig. Hierfür wurden denaturierende PAA-Gele mit 20 % (v/v) Acrylamidkonzentration verwendet, deren optimaler Trennbereich zwischen 12 und 55 Nukleotiden liegt.

Die Gellösung setzte sich zusammen aus: 7 M Harnstoff
 1x TBE-Puffer
 20 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid

Nachdem der Harnstoff vollständig gelöst war, wurde die Gellösung filtriert und die Polymerisation durch Zugabe von $\frac{1}{100}$ Volumen 10 % (w/v) APS und $\frac{1}{1000}$ Volumen TEMED gestartet. Die Lösung wurde zwischen zwei gut gesäuberte, mit Ethanol abgeriebene und horizontal übereinander liegende Glasplatten gegossen. Ein zwischen die Glasplatten gesteckter Teflonkamm ermöglichte die Bildung von Probentaschen mit 20 - 50 µl Inhalt. Die Stärke des Gels richtete sich nach dem jeweiligen Verwendungszweck und wurde durch die Wahl geeigneter *spacer*, die zwischen die Glasplatten geklammert wurden, festgelegt. Sie betrug in der Regel 1 mm.

Um ein nachträgliches Polymerisieren von noch nicht umgesetzttem Acrylamid am Boden der Probentaschen zu verhindern, wurden diese sofort nach dem Entfernen des Kammes mit

1x TBE gespült. Um die Gele vorzutemperieren und eventuelle Konzentrationsunterschiede der Ionen zwischen Gelmatrix und Puffertank auszugleichen, wurde die Elektrophorese bereits 10 bis 30 min vor dem Auftrag der Proben gestartet. Unmittelbar vor dem Auftragen der Nukleinsäuren wurde der Stromfluss unterbrochen und die Taschen wurden erneut gespült. Die Elektrophorese wurde zunächst für 10 min bei 15 mA und anschließend konstant bei 25 mA durchgeführt. Der Fortschritt der Elektrophorese konnte anhand der im Probenpuffer enthaltenen Farbstoffe verfolgt werden. In 10 % igen PAA-Gelen wandern einzelsträngige DNA- bzw. RNA-Moleküle mit 12 bzw. 55 Nukleotiden Länge auf gleicher Höhe mit dem Bromphenolblau- bzw. Xylencyanol-Farbstoff.

3.2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA

Durch Messung der Lichtabsorption (Extinktion) bei 260 nm lässt sich auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmen (E = Extinktion; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient; c = Konzentration der Nukleinsäure; d = Schichtdicke der Küvette). Dazu wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung der Nukleinsäure in 1x TE-Puffer bei 260 nm gegenüber dem reinen Puffer in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (A_{260}) entspricht etwa folgender Nukleinsäuremenge:

1 A_{260} dsDNA entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$

1 A_{260} ssDNA entspricht 37 $\mu\text{g/ml}$

1 A_{260} RNA entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$

Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption sowohl bei 260 nm (ungefähres Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) als auch bei 280 nm (Absorptionsmaximum Proteine) lässt sich die Reinheit einer Nukleinsäurelösung unter Vorbehalt abschätzen

(Sambrook et al., 1989; Wilfinger et al., 1997). Eine reine DNA-Lösung besitzt einen A_{260}/A_{280} -Wert von 1,8 und eine reine RNA-Lösung einen Wert von 2,0. Bei Kontamination mit Protein oder Phenol ist dieser Wert signifikant kleiner.

3.2.3.4 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach folgenden Methoden isoliert:

Isolierung mittels Glasmilch

Diese Methode beruht auf der Eigenschaft von Silica-Material (z.B. Glasmilch), DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze zu binden. Nach einem Waschschrift kann die DNA dann durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden. Entsprechend dem Protokoll des *Gene Clean II-Kits* (Bio101) wurden die ausgeschnittenen Agarosegelstücke in einem Natriumjodid-haltigen Hochsalzpuffer bei 55 °C gelöst und mit der Silica-Suspension inkubiert. Nach den vorgegebenen Waschschriften wurde das pelletierte Silica-Material getrocknet und die DNA anschließend mit H_2O_{bidest} oder TE-Puffer eluiert.

Isolierung mittels spin column-Elution

Bei dieser Methode wird die DNA aus den Agarosegel-Stücken herauszentrifugiert. Hierfür wurden die Agarosegel-Stücke in ein Plastikgefäß gegeben, welches als Minisieb funktioniert. Vorwiegend verwendet wurden die kommerziell erhältlichen *Ultrafree®-MC Centrifugal Filter Units* von Millipore. Alternativ hierzu wurden auch selbst angefertigte Plastikgefäße verwendet (Abbildung 3.1). Diese bestanden aus einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß, bei welchem in den Boden mittels einer Kanüle ein Loch gestochen wurde. Der Boden des Reaktionsgefäßes wurde dann mit einem Stück silanisierter Glaswolle ausgestopft (maximal $\frac{1}{5}$ des Gefäßvolumens). Das Gelstück wurde in das 0,5 ml Gefäß gegeben und dieses auf ein zweites 2 ml-Reaktionsgefäß aufgesetzt. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 5.000 x g konnte die DNA-haltige Lösung aus dem unteren Auffanggefäß entnommen werden. Das Zentrifugat enthält ca 70 % der DNA. Eine

größere Ausbeute wurde erzielt, wenn die Agarose-Gelstücke vor dem Zentrifugieren in dem angefertigten Plastikgefäß für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und dann schnell bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut wurden.

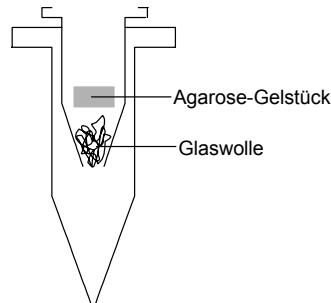


Abb. 3.1: Gelelektion mittels Zentrifugation. Darstellung eines selbstgebastelten Minifilters

3.2.3.5 Phenol-/Chloroform-Extraktion

Diese Methode dient zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Hierzu wurde die Nukleinsäurelösung nacheinander mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, (v/v)) und einem Volumen Chloroform bei RT kräftig ausgeschüttelt. Nach dem Ausschütteln wurde jeweils zur besseren Phasentrennung 5 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und die obere wässrige Phase unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt. Auf diese Weise wurden die Proteine denaturiert und sammelten sich in der organischen Phase bzw. der Phasengrenze, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst waren. Verbleibende Phenolreste wurden durch die Chloroformextraktion und eine anschließende Alkoholfällung (3.2.3.6) entfernt.

3.2.3.6 Alkohol-Fällung

Die Fällung von Nukleinsäuren mit bestimmten Alkoholen ist die gebräuchlichste Methode, um DNA oder RNA aus wässrigen Lösungen zu konzentrieren. Hierzu versetzt man eine Nukleinsäurelösung mit einem monovalenten Salz und gibt Ethanol bzw. Isopropanol dazu. Nach kräftigem Mischen fällt die Nukleinsäure aus und kann durch Zentrifugation pelletiert werden. Durch anschließendes Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol

werden Salz- und Alkoholreste entfernt. Neben Salzen bleiben auch viele andere kleine, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst, so daß ein Reinigungseffekt erzielt wird.

Zur Fällung wurde die wässrige Lösung mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,5-5,0) und mit 2,5-fachem Volumen absolutem Ethanol versetzt, gut gemischt und in der Kälte gefällt. In der Regel wurde der Ansatz für 20 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschliessend wurden die präzipitierten Nukleinsäuren durch eine 1 h dauernde Zentrifugation mit $15.000 \times g$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Der Überstand wurde mit einer zur Kapillare ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol (ca. $\frac{1}{3}$ des Fällungsvolumens) gewaschen und erneut 30 min mit $15.000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ bzw. 1x TE-Puffer gelöst.

Bei großvolumigen Lösungen wurde Isopropanol zur Fällung verwendet, welches Nukleinsäuren effektiver als Ethanol fällt. Bei RT wurde bereits mit dem 0,6-0,8-fachem Volumen Isopropanol eine quantitative Fällung erzielt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (s.o.), um restliche Salze bzw. restliches Isopropanol zu entfernen.

3.2.3.7 Konzentrierung von Nukleinsäuren mittels der *Speed-Vac*

Bei der *Speed-Vac* handelt es sich um eine Tischzentrifuge, an die ein Vakuum angelegt werden kann. Das Vakuum führt zu einer Siedepunktniedrigung bei Flüssigkeiten und damit zu einem raschen Verdampfen. Auf diese Weise konnten kleine Volumina Nukleinsäurelösungen mittels der *Speed-Vac* in kurzer Zeit eingetrocknet werden. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß es beim Verdampfen des Lösungsmittels unter Umständen zu einer Anreicherung an Salzen in der Lösung kommt. Ausserdem können Nukleinsäure-Pellets leicht „übertrocknet“ werden, so daß sie sich anschließend nur noch schwer in Lösung bringen lassen.

3.2.4 DNA-Techniken

3.2.4.1 Präparation von Gesamt-DNA aus *B. subtilis*-Zellen

Für einige der durchgeführten PCR-Analysen konnten auch mit Proteinen verunreinigte DNA-Präparationen verwendet werden. Eine Methode zur schnellen Herstellung von Gesamt-DNA aus Bakterienzellen bestand darin, 200 µl Zellsuspension einer Übernachtskultur bei 5.000 x g für 5 min zu pelletieren, das Zellpellet in dem gleichen Volumen H₂O_{bidest} zu resuspendieren und für 3 min bei 95 °C zu kochen. Dieser Schritt diente vor allem dazu, DNasen zu denaturieren. Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt (10 min bei 15.000 x g/4 °C) pelletiert und der Überstand wurde direkt als Templat für die PCR-Analyse verwendet.

3.2.4.2 Präparation von chromosomaler DNA aus *B. subtilis*-Zellen

Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* für *Southern Blot*-Analysen erfolgte mit AXG Anionenaustauschersäulen der Firma Macherey-Nagel. Dabei wurde entsprechend dem vom Hersteller angegebenen Standardprotokoll zur Isolierung genomischer DNA aus Bakterien vorgegangen. Zur effizienteren Lyse wurden die Zellen vor Zugabe des Lysepuffers für 40 min bei RT in G3-Puffer mit 2 mg/ml Lysozym und 500 µg/ml Proteinase K präinkubiert.

3.2.4.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die verwendete Methode zu Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA aus Bakterienzellen beruht auf der Lyse von Zellen durch SDS unter alkalischen Bedingungen (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1983). Während das SDS an Proteine bindet und diese denaturiert, werden chromosomale und Plasmid-DNA bei stark alkalischem pH denaturiert. Durch die Zugabe von Kaliumacetat wird die Mischung neutralisiert, was zu einer Renaturierung der Plasmid-DNA führt. Die größere chromosomale DNA bleibt einzelsträngig und präzipitiert durch die hohe Salzkonzentration ebenso wie denaturierte Proteine und Kalium-komplexiertes SDS.

Bei der Präparation von Plasmid-DNA aus dem grampositiven Bakterium *B. subtilis* wurde die Zellsuspension unmittelbar vor der alkalischen Lyse zusätzlich mit Lysozym inkubiert. Im Vergleich zur Präparation aus *E. coli* war hier die Ausbeute und Reinheit der Plasmid-DNA bedeutend schlechter. Eine Ursache ist sicherlich die bei *Bacillus* vorhandene dicke Peptidoglycanschicht mit ihren kovalent gebundenen Polyanionen (Teichonsäure und Teichuronsäure). Eine unvollständige Zellyse hat schlechte Ausbeuten und möglicherweise mit Zellwandmaterial kontaminierte Plasmid-DNA zur Folge. Um dieses Problem zu reduzieren, wurden bei dem Lyse-Schritt Zellsuspensionen mit niedriger Dichte eingesetzt. Hierzu wurde im Vergleich zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* nur das 0,3-fache Volumen einer *B. subtilis*-Kultur für die Plasmidpräparation verwendet.

Ein weiteres Problem bei der Plasmid-DNA-Präparation aus *B. subtilis* können die zellassoziierten und extrazellulären Nukleasen darstellen, die vor allem während der post-exponentiellen Wachstumsphase ins Medium sezerniert werden. Die Plasmid-DNA-Präparationen wurden demnach vorwiegend mit Zellmaterial aus der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt.

Analytische Präparation von Plasmid-DNA

NaOH-Stammlösung:	10 M NaOH
SDS-Stammlösung:	25 % (w/v) SDS
Lysozym-Stammlösung	100 mg/ml in Lösung A
TSE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM EDTA
Lösung A:	10 mM Tris/HCl pH 8,1 10 mM EDTA 50 mM NaCl 20 % (w/v) Sucrose
Lösung B:	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS (frisch angesetzt aus separaten Stammlösungen)

Lösung C:

60 ml 5 M Kaliumacetat

11,5 ml Eisessig

ad 100 ml mit H₂O_{bidest} (pH ~ 4,8; bei 4 °C lagern)

Die Aufarbeitung von Plasmid-DNA aus *B. subtilis* wurde nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt. Bei diesem Protokoll wird anfangs mit einem Hochsalz-Puffer gewaschen, der nicht-kovalent mit der Zellwand assoziiertes, kontaminierendes Material entfernen soll. Dies hat eine effektivere Lyse zur Folge.

Die Zellen einer über Nacht gewachsenen 1,2 ml-Kultur wurden durch einen Zentrifugationsschritt (5 min bei 5.000 x g) pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen zweimal mit TSE-Puffer gewaschen. Für jeden Waschschrift wurden die Zellen in 1,2 ml TSE-Puffer resuspendiert und anschließend wieder pelletiert (s.o.). Danach wurde das Zellpellet in 200 µl Lösung A aufgenommen und Lysozym (Endkonzentration 2 mg/ml) zugegeben. Nach 10-20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension auf Eis gestellt und mit 400 µl Lösung B vermischt, 10 s gevortext und 4 min auf Eis inkubiert (die Lösung sollte dabei klar werden, ansonsten wurde erneut 10 s gevortext). Zur Neutralisation wurden 300 µl eiskalte Lösung C zugegeben, das Gemisch wurde 10 s gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat 6 min bei 15.000 x g/4 °C sedimentiert. Etwa 600 µl des Überstands wurden daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Phenol gemischt, 4 min gevortext und 4 min bei 15.000 x g zur Phasentrennung zentrifugiert. Von der oberen wässrigen Phase wurden nun 500 µl in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; (v/v)) kräftig geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 2 min bei 15.000 x g wurden die Nukleinsäuren abschließend aus 450 µl der oberen Phase durch eine Alkohol-Fällung (3.2.3.6) präzipitiert und in 20 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Nach Bedarf erfolgte im Anschluß eine 10-minütige Behandlung mit RNase A (Endkonzentration 100 µg/ml) bei 37 °C, um die enthaltene RNA zu verdauen.

Alternativ wurde zur schnellen Aufarbeitung von Plasmid-DNA aus 3 ml Kulturvolumina der Nucleo Spin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel bzw. der QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Die Präparation mittels der Zentrifugations-Säulchen mit Silicamembran wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde standardmäßig mit den kommerziell erworbenen Kits präpariert. Bei Plamid-DNA-Präparationen aus *B. subtilis* wurden die Zellen zur effektiveren Zellyse vor Zugabe des Lysepuffers für 10–20 min bei RT mit 2 mg/ml Lysozym präinkubiert.

Präparative Präparation von Plasmid-DNA

Bei der präparativen Plasmidisolierung wurden Anionenaustauschersäulen (modifiziertes Silicagel) der Firmen Qiagen und Macherey-Nagel verwendet (standardmäßig Qiagen-tip 100 bzw. AX100 für 30-50 ml Zellkultur mit *high-copy* Plasmid). Die Anionenaustauschersäulen bestehen aus einer Matrix, die positiv geladene Gruppen besitzt. Die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren sind oberhalb von pH 2 negativ geladen und binden folglich gut an die Anionenaustauscher. Da die Stärke der Bindung für DNA und Proteine unterschiedlich ist und ausserdem vom pH und der Ionenstärke des Puffers abhängen, lassen sich DNA-Präparationen mit dieser Methode sehr gut aufreinigen. Nach Aufreinigung entsprechend den Herstellerprotokollen wurde die Plasmid-DNA mittels einer Isopropanol-Fällung konzentriert.

3.2.4.4 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen 4-8 Basenpaare umfassende, meist palindromische Sequenzabschnitte doppelsträngiger DNA. Sie katalysieren die Hydrolyse an genau definierbaren Stellen innerhalb solcher Zielsequenzen und generieren je nach Enzym 5'- bzw. 3'-überhängende oder stumpfe Enden mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen.

Für die Spaltung wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10x Reaktionspuffer verwendet. Sofern nicht im mitgelieferten 10x Puffer enthalten, wurde zudem $\frac{1}{10}$ Volumen BSA (1 mg/ml) zugegeben, um die Enzymstabilität zu erhöhen und eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch unspezifisches Anhaften an der Wandung des Plastikgefäßes zu unterbinden. Da die Restriktionsenzyme in Glycerin-haltigem Puffer gelöst sind, betrug das Volumen der eingesetzten Enzymlösung maximal $\frac{1}{10}$ Volumen des Gesamtansatzes, um mögliche Fehlsplaltungen durch zu hohe Glycerinkonzentrationen zu vermeiden. Demzufolge wurden 1-10 Units Enzym pro μg DNA in einem Reaktionsvolumen von 10-80 μl eingesetzt.

Bei Restriktionsspaltungen zu analytischen Zwecken wurde die Reaktion für 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur durchgeführt und nachfolgend mittels Gelelektrophorese (3.2.3.1) kontrolliert. Präparative Ansätze wurden in der Regel über Nacht mit dem Restriktionsenzym inkubiert. Im Anschluß wurde zur Entfernung des Enzyms sowie der im Puffer enthaltenen Salze eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.3.5) mit nachfolgender Ethanol-Fällung (3.2.3.6) durchgeführt. Um für eine Ligation geeignete linearisierte Vektoren oder Fragmente zu erhalten, erfolgte eine Aufreinigung mittels

Gelelution (3.2.3.4), da auf diese Weise kleinere Fragmente und Reste ungespaltener DNA abgetrennt wurden.

Bei Spaltungen mit zwei Restriktionsenzymen wurde - falls die erforderlichen Reaktionsbedingungen zu unterschiedlich waren - die DNA sukzessive mit den Enzymen inkubiert. Zwischen den Spaltungsreaktionen wurde dabei eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.3.5) mit anschließender Ethanolpräzipitation (3.2.3.6) durchgeführt.

3.2.4.5 Dephosphorylierung von DNA

Sollte ein Plasmid nach der Linearisierung für eine Ligation eingesetzt werden, so wurden die 5'-Enden zuvor durch das Enzym Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, *calf intestine alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse der 5'-terminalen Phosphatgruppen und generiert dabei unter Freisetzung von anorganischem Phosphat Hydroxylgruppen an den 5'-Enden der DNA-Fragmente. Dadurch wird bei der anschließenden Klonierung eine unerwünschte Selbstligation der Plasmid-DNA verhindert. Andernfalls würden Transformanten resultieren, deren Vektor nicht die gewünschte DNA-Insertion enthält.

Der Reaktionsansatz besteht aus:

20 - 50 µg linearisierte DNA

5 µl 10x Dephosphorylierungspuffer

10 Units CIP

ad 50 µl mit H₂O_{bidest}

Es wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden nochmals 3 µl 10x Dephosphorylierungspuffer, 3 Units CIP und ein entsprechendes Volumen H₂O_{bidest} nachpipettiert und weitere 30 min bei 50 °C inkubiert. Nach einer erneuten Zugabe der drei Lösungen (2 µl 10x Dephosphorylierungspuffer, 2 Units CIP und dem entsprechenden Volumen H₂O_{bidest}) erfolgte ein dritter Inkubationsschritt für erneut 30 min bei 37 °C. Die Ansätze wurden abschließend mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.3.5) oder Gelelution (3.2.3.4) gereinigt. Dieser Schritt war besonders wichtig, da die Alkalische Phosphatase besonders stabil ist und verhindert werden muß, daß bei der späteren Ligation auch das zu insertierende DNA-Fragment dephosphoryliert wird.

3.2.4.6 5'-Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden

Die Polynukleotidkinase des *E. coli*-Phagen T4 wurde verwendet, um die terminale γ -Phosphatgruppe von ATP auf die freie 5'-Hydroxylgruppe einer Nukleinsäure zu übertragen. Dies geschah entweder zur radioaktiven Markierung der Nukleinsäure unter Verwendung von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP oder um *Primer* vor der PCR für eine anschließende Ligation nicht-radioaktiv zu phosphorylieren.

Bei der Phosphorylierungsreaktion zur radioaktiven Markierung von DNA-Oligonukleotiden wurden 50 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) eingesetzt. Das molare Verhältnis $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP zu 5'-Hydroxylende bzw. DNA-Oligonukleotid betrug hierbei 1:1,2. Falls das zu markierende Oligonukleotid bereits eine terminale 5'-Phosphatgruppe besaß, mußte es zuvor mittels der Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert werden.

Der Reaktionsansatz für die radioaktive Markierung:

2 μl 10 μM DNA-Oligonukleotid (\equiv 20 pmol)
 4 μl 5x T4 Kinase-(*forward*) Puffer
 4 μl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (\equiv 16,7 pmol ATP bzw. 50 μCi)
 1 μl T4 Polynukleotid-Kinase (10 Units/ μl)
ad 20 μl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Der Ansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 4 μl 0,1 M EDTA (\equiv 5 mM Endkonz.) gestoppt. EDTA komplexiert hierbei die für die Reaktion essentiellen Mg^{2+} -Ionen. Die DNA-Oligonukleotide wurden mittels Nick-Säulen (Sephadex G50 von Pharmacia) von überschüssigem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP entsprechend den Herstellerangaben getrennt.

Bei der nicht-radioaktiven Kinasierung von *Primern* enthielt der Reaktionsansatz folgende Komponenten:

5 μl *Primer* bzw. DNA-Fragment (2 μg)
 5 μl 5x T4 Kinase-(*forward*) Puffer
 8 μl 3 mM ATP (1 mM Endkonzentration)
 1 μl T4 Polynukleotid-Kinase (10 Units/ μl)
ad 24 μl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Der Ansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung (10 min bei 70 °C) gestoppt.

3.2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation dient der Verknüpfung von doppelsträngiger DNA mit komplementären überhängenden oder glatten Enden. Die Methode wurde meist eingesetzt, um DNA-Fragmente („DNA-Inserts“) in ein linearisiertes Plasmid zu integrieren. Dazu wurde die DNA-Ligase des *E. coli*-Phagen T4 mit ATP als Coenzym verwendet. Die DNA-Ligase knüpft dabei Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen der DNA-Fragmente.

Die verwendeten DNA-Fragmente und linearisierten Plasmide wurden zuvor mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3.1) analysiert. Bei Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen liegt die Nachweisgrenze bei etwa 10 ng DNA je Bande. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Ligation DNA-Mengen eingesetzt, die gerade noch auf dem Agarosegel sichtbar waren. Die Effizienz der Ligationsreaktion hängt stark vom molaren Verhältnis des eingesetzten DNA-Materials und der Art der Fragmentenden ab. Deshalb wurden die DNA-Mengen entsprechend der Tabelle 3.2 variiert, um auf diese Weise einen möglichst großen Konzentrationsbereich abzudecken. Laut Literatur soll das molare Verhältnis *Insert*-DNA zu Vektor-DNA bei Ligationen mit glatten Enden 100:1 und bei Ligationen mit überhängenden Enden 5:1 betragen.

Ansatz Nr.	Vektor-DNA (5-50 fmol/μl)	Insert-DNA (25-250 fmol/μl)	T4 DNA- Ligase	5x Puffer	10 mM ATP	H ₂ O _{bidest}
1	2 μl	2 μl	1 μl	2 μl	1 μl	2 μl
2	2 μl	2 μl (1:10)	1 μl	2 μl	1 μl	2 μl
3	2 μl (1:10)	2 μl	1 μl	2 μl	1 μl	2 μl
4	2 μl (1:10)	2 μl (1:10)	1 μl	2 μl	1 μl	2 μl
5	2 μl	—	1 μl	2 μl	1 μl	4 μl
6	2 μl	—	—	2 μl	1 μl	5 μl
7	—	—	1 μl	2 μl	1 μl	6 μl

Tab. 3.2: 10 μl Reaktionsansätze mit Ligations-Kontrollen.

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden standardmäßig mit den Ligationsansätzen 1-7 aus Tabelle 3.2 transformiert (3.2.2.1). Mit dem Ligationsansatz Nr. 5 wurde die Effizienz der Dephosphorylierungsreaktion kontrolliert, mit dem Ansatz Nr. 6 wurde der Anteil an ungeschnittener Plasmid-DNA bestimmt und Ansatz Nr. 7 diente als Negativkontrolle. Die Ligation erfolgte bei Fragmenten mit überhängenden Enden bei Raumtemperatur (5 h bei 5'-Überhang bzw. über Nacht bei 3'-Überhang), bei glatten Enden wurden die Ligationsansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Vor der Bakterientransformation (3.2.2.1) wurde der Ligationsansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert, um die T4 DNA-Ligase zu inaktivieren.

3.2.4.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR; Saiki et al., 1985) dient der enzymatischen Amplifikation geringer Mengen an DNA. Dazu benötigt werden eine thermostabile DNA-Polymerase, ein wenig Ausgangs-DNA (Templat) als Matrize, zwei dazu komplementäre und im Überschuß vorliegende DNA-Oligonukleotide (*Primer*) als Polymerisationsstarter, Desoxynukleosidtriphosphate sowie ein Mg^{2+} -haltiger Reaktionspuffer.

Bei PCR-Reaktionen für analytische Zwecke wurde in der vorliegenden Arbeit vorwiegend die aus dem gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Dieses Enzym hat sein Aktivitätsmaximum bei 74 °C und einem pH von 8-9. Neben der DNA-abhängigen 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität besitzt es zusätzlich eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Eine Besonderheit der *Taq*-DNA-Polymerase ist eine templatunabhängige Polymeraseaktivität. Diese führt dazu, daß häufig eine zusätzliche Base - überwiegend ein Adenosin - an das Ende des neu synthetisierten Stranges angehängt wird. Die DNA-Syntheserate liegt bei zirka 1.000 Nukleotide/0,5-1 min mit einer Fehlerrate von 8×10^{-6} .

Bei der PCR-Amplifikation von Fragmenten für Klonierungen war eine hohe Genauigkeit bei der DNA-Synthese erforderlich. Hier wurden die aus Archaea isolierten Enzyme *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) oder *Pwo*-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*) verwendet. Diese Polymerasen besitzen ein zusätzliches 3'-5'-Exonukleasezentrum, das ein Korrekturlesen (*proofreading*) ermöglicht. Die Fehlerrate liegt hier bei etwa $1,3 \times 10^{-6}$ und die Amplifikationsprodukte besitzen im Gegensatz zu den Produkten der *Taq*-Polymerase keinen Basenüberhang, sondern glatte Enden. Allerdings ist die Syntheserate bei den Enzymen mit *proofreading*-Aktivität erniedrigt. Sie liegt bei etwa 1.000 Nukleotide/1-2 min.

Die zyklische Reaktionsfolge eines PCR-Programms unterteilt sich in einen Denaturierungsschritt bei 95 °C (trennt die DNA-Stränge), einen *Annealings*schritt bei einer Temperatur, die auf die Länge und den G+C-Gehalt der *Primer* abgestimmt ist (sequenzspezifische Hybridisierung der Oligonukleotid*primer* an die einzelsträngige Templat-DNA) und einem Elongationsschritt bei 72 °C (die *Primer* werden komplementär zum Templat verlängert).

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

5 µl 10x *Pfu*-Polymerase-Puffer

5 µl Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (jedes 2,5 mM)

je 2 µl der beiden *Primer* (je 10 µM)

2 µl DNA-Templat (100 ng/µl chromosomale DNA bzw. 10 ng/µl Plasmid-DNA)

1.0 µl *Pfu*-Polymerase (2.5 Units/µl)

ad 50 µl mit H₂O_{bidest}

Das sogenannte „*touchdown*“-PCR-Programm (mit Temperatur-Inkrement) setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

1	4 min	95 °C	
2	45 s	95 °C	
3	45 s	55-75 °C * (-0,4 °C/Zyklus)	15 Zyklen
4	1-2 min	72 °C	
5	45 s	95 °C	
6	45 s	49-69 °C **	10 Zyklen
7	1-2 min	72 °C	
8	5 min	72 °C	

* die *Annealing*-Temperatur war *Primer*-spezifisch und lag in der Regel in einem Bereich von 55-75 °C

** die *Annealing*-Temperatur nach den 15 Zyklen mit Temperatur-Inkrement war 6 °C niedriger als die *Annealing*-Temperatur in Schritt 3

Der 1. Schritt diente der initialen Aufschmelzung der Templat-DNA. Während der ersten 15 Zyklen (Schritt 2-4) wurde ein Temperaturgradient programmiert, so daß die *Annealing*-Temperatur pro Zyklus um 0,4 °C erniedrigt wurde (Temperatur-Inkrement). Die Elongationszeit in Schritt 4 und 7 wurde an die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und die Syntheserate der eingesetzten DNA-Polymerase angepaßt. Die finale

Elongation in Schritt 8 wurde durchgeführt, um etwaige in den vorangegangenen Schritten nicht zuende geführte Zweitstrangsynthesen zu vervollständigen.

3.2.4.9 Southern Blot

Denaturierungslösung:	0,2 M HCl
Transferpuffer:	1 M NaOH
20x SSC:	0,3 M Natriumcitrat/NaOH pH 7,0 3 M NaCl
50x Denhardt's Lösung (500 ml):	5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA
Hybridisierungslösung:	50 % (v/v) Formamid (destabilisiert H-Brücken) 5x SSC 5x Denhardt's Lösung 0,1 % (w/v) SDS 50 mM NaH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 6,5 50 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

Die 1975 von E.M. Southern (Southern, 1975) entwickelte *Blotting*-Technik für DNA ermöglicht den Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente auf eine Membran (Nylon- oder Nitrocellulose-Membran). Durch Hybridisierung mit markierten Sonden können daraufhin einzelne auf der Membran fixierte DNA-Fragmente spezifisch detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Transfer der DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran mittels der Vakuum-Transfer-Methode mit alkalischem Puffer. Zu diesem Zweck wurde die Apparatur VacuGene der Firma Pharmacia Biotech in Verbindung mit einer regulierbaren Niederdruckpumpe verwendet. Dies ermöglichte in Anwesenheit des alkalischen Puffers den effizienten Transfer selbst hochmolekularer DNA innerhalb nur weniger Stunden.

Vakuum-Transfer

Nach der elektrophoretischen Auftrennung Restriktionsenzym-verdauter chromosomaler DNA (2-4 µg DNA/Spur) auf einem 0,7 %igen Agarose-Gel bei maximal 60 mV wurden unter UV-Licht mit einer Pasteurpipette Löcher in die Banden des mitgelaufenen Größenstandards gestanzt, um eine Zuordnung von detektierten Fragmenten nach der Autoradiographie zu erleichtern. Der zurechtgeschnittene Nylonfilter (Hybond-N; Amersham) wurde auf die poröse Kunststoff-Unterlage der Apparatur gelegt und die freibleibende Fläche mit einer Maske aus Kunststoffolie abgedeckt. Die Maskenaussparung war etwa 2-3 mm kleiner als das Agarose-Gel, welches nun luftblasenfrei auf den Nylonfilter gelegt wurde. Nylonfilter und Gel wurden zuvor kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ angefeuchtet. Nach dem Anlegen des Vakuums (~60 mbar) wurde das nun konkav gewordene Gel mit der Denaturierungslösung überschichtet und für ca. 30 min inkubiert, bis die Farbmaler Bromphenolblau in gelb und Xylencyanol in blau umgeschlagen waren. Durch diesen HCl-Schritt wird die DNA teilweise depuriniert und zerbricht dann in kleinere Fragmente, was den Transfer längerer Moleküle verbessert. Nach dem Abnehmen der Denaturierungslösung mit einer Pipette wurde die DNA dann - weiterhin unter Vakuum - mit der Transferlösung für ca 1,5 h auf die Membran geblottet. Hierzu wurde die Kammer mit dem Transferpuffer auf die ca 3-fache Gelhöhe aufgefüllt. Mittels der Transferlösung werden die DNA-Stränge getrennt, so daß einzelsträngige Moleküle mit ungepaarten Basen entstehen. Dies dient der im Anschluß folgenden Hybridisierungsanalyse. Nach dem Transfer wurde die Lösung mit einer Pipette von der Geloberfläche entfernt und die eingestanzten Markierungen des Gels mit einem Kugelschreiber durch die Löcher auf den Nylonfilter übertragen. Die Effizienz des Transfers wurde überprüft, indem das Agarose-Gel unter UV-Licht gelegt wurde. Die Nylonmembran wurde anschließend zwischen zwei 3MM Whatman-Filterpapiere gelegt und für 30 min bei 80 °C getrocknet. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (20 s bei 254 nm) auf der Nylonmembran immobilisiert. Dieses kovalente „crosslinking“ der DNA auf der Oberfläche erlaubt die mehrmalige Rehybridisierung mit verschiedenen Sonden. Bei Bedarf konnte die Nylonmembran nach der Immobilisierung in Plastikfolie eingeschweißt und bis zur Hybridisierung bei 4 °C gelagert werden.

Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurde die Nylonmembran kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ angefeuchtet und dann für 2 h bei 42 °C in Hybaid-Glasröhrchen (mittlere Größe) mit 8 ml Hybridisierungslösung präinkubiert. Diese und die folgenden Inkubationsschritte erfolgten unter Rotation im

Hybridisierungssofen. Nach der Prähybridisierung erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde in 8 ml Hybridisierungslösung ($1,5 \times 10^6$ cpm/ml) über Nacht bei 42 °C. Zur Entfernung der unter diesen Bedingungen nicht gebundenen radioaktiven DNA wurden zwei Waschschrirte durchgeführt. Die Hybridisierungslösung wurde dekantiert und die Nylonmembran zunächst für 10 min mit insgesamt 80 ml 2x SSC bei Raumtemperatur durch Hin- und Herrollen des Glasröhrchens vorgewaschen. Nach Abkippen der Lösung wurde der Filter für 60 min mit insgesamt 100 ml 2x SSC/1 % SDS bei der für die DNA-Sonde berechneten Waschttemperatur inkubiert. Die Waschttemperatur richtete sich dabei nach der Schmelztemperatur T_M der DNA-Sonde und erfolgte bei einer Temperatur von $0,8 \times T_M$. Die Schmelztemperatur wurde in diesem Zusammenhang näherungsweise nach dem G+C-Gehalt des Oligonukleotids berechnet:

$$T_M = 4x (\text{Anzahl G+C}) + 2x (\text{Anzahl A+T})$$

Abschließend wurde die Nylonmembran an der Luft getrocknet und zunächst über Nacht bei -80 °C autoradiographiert.

3.2.5 RNA-Techniken

Das Arbeiten mit RNA erfordert einige Vorsichtsmaßnahmen, da diese Nukleinsäuren empfindlich gegen Hydrolyse sind. Dies gilt besonders für pH-Werte kleiner 4 oder oberhalb 8. Außerdem muß steril und vor allem RNase-frei gearbeitet werden, wobei Kontaminationen leicht durch Handschweiß, Speichel und vor allem unsterile Pufferlösungen erfolgen können. Die Pufferlösungen wurden daher generell bei -20 °C gelagert. Da etliche RNasen keine Cofaktoren wie z.B. Mg^{2+} benötigen und zum Teil extrem stabil sind, wurden Lösungen für Arbeiten mit RNA mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine (z.B. Histidin) und führt zu kovalenten Bindungen, wodurch RNasen inaktiviert werden. Dazu wurden $1/200$ Volumen DEPC zu den Lösungen gegeben und 2 h kräftig bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluß wurden die Lösungen zweimal autoklaviert, wodurch DEPC zu CO_2 /Ethanol zerfällt und verdampft. Primäre Amine enthaltende Puffer (z.B. Tris) wurden ersatzweise mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Alle verwendeten Glaswaren wurden für 4 Stunden bei 180 °C gebacken, ansonsten wurden sterile Einwegutensilien verwendet.

3.2.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *B. subtilis*-Zellen

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Lysepuffer:	30 mM Tris/HCl pH 7,4 100 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % (w/v) SDS
saures Phenol:	Phenol mehrmals mit 300 mM Natriumacetat- lösung (pH 5,0) ausgeschüttelt

Die RNA-Isolierung wurde nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt:

„single step“-Methode

Vorwiegend verwendet wurde der kommerzielle Kit „RNeasy™ Mini Kit“ von Qiagen, der auf der „single step“-Methode basiert (Chomczynski und Sacchi, 1987; Chomczynski und Mackey, 1995). Mit diesem Kit konnte zelluläre RNA ≥ 200 Nukleotide isoliert werden. Die Zellen werden hierbei in Gegenwart einer Guanidinisothiocyanat- (GITC-) Lösung lysiert und homogenisiert. GITC ist ein chaotropes Salz, welches sehr effektiv Proteine - inklusive RNasen - denaturiert und inaktiviert. Durch die Zugabe von Ethanol werden die entsprechenden Bindungsbedingungen für den Auftrag des Zellysats auf ein Zentrifugations-Säulchen mit Silicamembran (Bindekapazität 100 μg RNA) hergestellt. Die RNA adsorbiert an die Membran und das restliche Zellmaterial kann effizient durch Waschschrte entfernt werden. RNA mit hohem Reinheitsgrad kann nachfolgend mittels RNase-freiem H_2O eluiert werden.

Bei der RNA-Isolierung aus *B. subtilis* wurden die Zellen vor der Lyse für 15 min bei Raumtemperatur in TE-Puffer mit 3 mg/ml Lysozym inkubiert. Pro Säule wurden ca 5×10^8 Zellen eingesetzt (empirisch für *B. subtilis* YB886: 1 OD_{600} entspricht $2,8 \times 10^8$ Zellen/ml). Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 20-30 μg RNA/Säule. Falls die Versuchsbedingungen es erlaubten, erfolgte die RNA-Präparation aus Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase.

saure Phenol-Methode

Durch die Extraktion mit Phenol unter sauren Bedingungen konnten auch kleine RNA-Moleküle (< 200 Nukleotide) schnell und in hoher Ausbeute aus Bakterien isoliert werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß sich in saurem Phenol auch kleinere DNA-Fragmente lösen. Die größeren Fragmente und Proteine sammeln sich nach der Zentrifugation an der Interphase, während die RNA in der wässrigen Phase verbleibt.

10 ml Bakterienkultur wurden 5 min bei 4°C und 5.000 x g pelletiert und in 500 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 600 µl saurem Phenol (auf 60 °C vorgewärmt) wurde der Ansatz kräftig geschüttelt und für 5 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß an einen weiteren Inkubationsschritt für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Phasentrennung bei 15.000 x g in der Tischzentrifuge. Die wässrige Phase wurde danach erneut wie beschrieben mit saurem Phenol extrahiert. Zuletzt erfolgten zwei Extraktionen mit jeweils 500 µl Chloroform. Das Gemisch wurde jeweils 2 min kräftig geschüttelt und die Phasentrennung wiederum durch Zentrifugation erzielt. Abschließend wurde die RNA aus dem Überstand durch eine Ethanolfällung (3.2.3.6) präzipitiert.

Trizol®Reagenz (Invitrogen)

Alternativ wurde das kommerziell erhältliche Trizol®Reagenz zur Präparation von Gesamt-RNA aus den Bakterienzellen verwendet. Laut Hersteller können mit diesem Reagenz kleine und große RNA-Spezies isoliert werden. Zur Resuspension von 1 g Zellpellet (Naßgewicht) wurden dabei 2,2 ml Trizol®Reagenz verwendet. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Herstellerangaben.

3.2.5.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Der Nachweis der Genexpression auf RNA-Ebene kann mittels einer Reversen Transkription (cDNA-Synthese) erfolgen, die mit einer PCR-Amplifikation gekoppelt wird. Mit dieser sensitiven RT-PCR-Methode lassen sich Aussagen über das Vorhandensein bzw. Fehlen eines Transkripts machen. In Verbindung mit einem internen Standard - von dem man eine konstante Expressionsrate annimmt - läßt sich begrenzt auch die Expressionsstärke eines Gens bestimmen.

Die RT-PCR-Analyse erfolgte mit dem Access RT-PCR System von Promega. Hier wird die RNA zunächst von der AMV Reversen Transkriptase (aus dem *Avian-Myeloblastosis-Virus*) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (\equiv Erststrang-DNA-Synthese). Die Arbeitstemperatur dieser RNA-abhängigen DNA-Polymerase liegt mit 48 °C relativ hoch, so daß Sekundärstrukturen der RNA besser überwunden werden. Die anschließende DNA-Amplifikation wird mit der thermostabilen *Tfl*-DNA-Polymerase (aus *Thermus flavus*) durchgeführt (\equiv Zweitstrang-DNA-Synthese). Ein dazwischenliegender Inkubationsschritt für 2 min bei 94 °C inaktiviert die AMV Reverse Transkriptase und denaturiert RNA/cDNA-Hybride. Zur Reduktion einer Kontaminationsgefahr durch Umpipettieren findet die Reaktion in einem Gefäß mit einem für beide Enzyme optimiertem Puffersystem statt.

Die bei der RT-PCR-Analyse als Ausgangsmaterial verwendete RNA-Präparation wurde zuvor mit RNase-freier DNase I (1 Unit/ μ g RNA) von Promega für 30 min bei 37 °C behandelt und anschließend nochmals mit Phenol/Chloroform (3.2.3.5) extrahiert. Dieser Schritt sollte sicherstellen, daß die Präparation nicht mit DNA kontaminiert war. Für Erststrang- und Zweitstrang-DNA-Synthese wurden spezifische *Primer* verwendet. Das vom Hersteller angegebene Protokoll wurde bzgl. RNA-Templat-Menge, *Primer*-Konzentration und Zyklenzahl bei der Zweitstrang-DNA-Synthese modifiziert:

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

10 μ l 5x AMV/*Tfl* Reaktionspuffer

1 μ l Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (jedes 10 mM)

je 2 μ l der beiden spezifischen *Primer* (je 10 μ M)

2 μ l 25 mM MgSO₄

1,2 - 1,5 μ g RNA-Templat

1,0 μ l AMV Reverse Transkriptase (5 Units/ μ l)

1,0 μ l *Tfl* DNA-Polymerase (5 Units/ μ l)

ad 50 μ l mit Nuklease-freiem H₂O_{bidest}

Lösung gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren für 5 min bei 5.000 x g und 4 °C wurde das Präzipitat zweimal in 7 ml eiskaltem Aceton durch wiederholtes Resuspendieren und Zentrifugieren (s.o.) gewaschen. Das luftgetrocknete Proteinpellet konnte zum Abschluß in TUS-Puffer resuspendiert werden. Die Resuspension des Präzipitats erfolgte jeweils mittels Ultraschall (Sonicator Sonoplus GM70, Bandelin) bei 50 %-Pulsen auf Eis. Nach der abschließenden Resuspension wurde der pH kontrolliert und bei Bedarf mit NaOH neutralisiert.

3.2.6.2 Analytische SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE steht für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und ermöglicht die Auftrennung von Polypeptiden nach ihrem Molekulargewicht. Bei der Methode nach Laemmli (1970) wandern mit dem anionischen Detergenz SDS beladene Polypeptide aufgrund der zusätzlichen negativen Ladungen, welche die Eigenladungen der Polypeptide effektiv überdecken, in diskontinuierlichen vertikalen Polyacrylamidgelen im elektrischen Feld zur Anode. Hierbei ist in einem bestimmten Bereich der SDS-Konzentration der Beladungsgrad unabhängig von der Natur des Proteins und die Wanderungsgeschwindigkeit praktisch nur noch vom Molekulargewicht und der Zusammensetzung der Gele abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Auftrennung der Polypeptide das von Schägger und Jagow (1987) modifizierte Gelsystem verwendet. Durch eine Erhöhung der Molarität der Puffer sowie der Verwendung von Tricin anstelle von Glycin im Elektrodenpuffer wird eine verbesserte Auflösung im niedermolekularen Bereich (besonders zwischen 5-20 kDa) erzielt. Zudem ist dieses System unempfindlicher gegenüber Proben mit hohen Salzkonzentrationen (bis zu 2,2 M NaCl sind tolerierbar). Im Anoden- und Kathodenreservoir wurden zwei verschiedene Elektrophoresepuffer verwendet (Anoden- und Kathodenpuffer). Da die Mobilität des Tricins relativ unabhängig vom pH ist, unterscheiden sich Sammel- und Trenngelpuffer hinsichtlich des pH-Wertes nicht voneinander.

Herstellung von SDS-Gelelen

Schäggergelpuffer (3x konz.)	3 M Tris/HCl pH 8,45 0,4 % (w/v) SDS
APS-Stammlösung	10 % (w/v) in H ₂ O _{bidest}

Zur Analyse der RNase P-Proteine wurden Trenngele mit Acrylamidkonzentrationen von 13 % eingesetzt, die Konzentration des Sammelgels betrug 4 % (siehe Tabelle 3.3). Die Gele in der Gelkammer „Multigel-Long“ von Biometra waren 1,0 mm dick und besaßen ein Volumen von ca 15 ml. Minigele in der Gelkammer Mini Sub Cell (Bio-Rad) wurden mit 0,75 mm-Spacer gegossen und besaßen ein Volumen von 5 ml.

Komponenten	Sammelgel (4%)	Trenngel (13 %)
Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)	2,0 ml	13,0 ml
Gelpuffer (3 x konz.)	5,0 ml	10,0 ml
H ₂ O _{bidest}	8,0 ml	7,0 ml
TEMED	10 µl	15 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	150 µl

Tab.3.3: Mengenangaben für zwei Polyacrylamidgele in der „Multigel-Long“ Gelkammer

Sammelgellösung und Trenngellösung wurden bei 4 °C gehalten, um die Polymerisation der Acrylamid-Monomerlösung, welche durch Zugabe von APS und TEMED einsetzt, zu verzögern. Nach der Zugabe der Startreagenzien wurde das Trenngel zwischen die zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um ein Eindringen von Luftsauerstoff in die Monomerlösung zu verhindern und eine ebene Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. Ein zwischen die Glasplatten gesteckter Teflonkamm ermöglichte die Bildung von Probenaschen mit 20-40 µl Inhalt. Nach weiteren 30 min konnten die Teflonkämme entfernt und die Gele beladen werden.

Probenauftrag und Elektrophorese

Protein-Probenpuffer (4x konz.) : 100 mM Tris/HCl pH 6,8
 8 % (w/v) SDS
 24 % (v/v) Glycerin
 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol
 *(nach Einstellen des pH-Wertes Zugabe
 von 0,04 % (w/v) Bromphenolblau)*

Anodenpuffer (5x konz.): 1 M Tris/HCl pH 8,9

Kathodenpuffer (5x konz.): 0,5 M Tris/HCl pH 8,25
 0,5 M Tricin
 (den 1 x Puffer vor Gebrauch auf 0,1 % (w/v)
 SDS einstellen)

Die Glasplatten mit den fertig gegossenen SDS-Gelen wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die obere und untere Pufferkammer wurde mit dem entsprechenden Elektrodenpuffer gefüllt. Aliquots zu untersuchender Proteinproben wurden mit $\frac{1}{3}$ Volumen Probenpuffer gemischt und für 3 min auf 96 °C erhitzt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden folgende kommerziell erhältliche Markerproteine nach Herstellerangaben eingesetzt:

Rainbow™-coloured protein molecular weight marker (Amersham)

Myosin	220 kDa	blau
Phosphorylase B	97 kDa	braun
BSA	66 kDa	rot
Ovalbumin	45 kDa	gelb
Carboanhydrase	30 kDa	orange
Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa	blau
Lysozym	14,3 kDa	magenta

Die Elektrophorese dauerte bei konstanter Spannung (Sammelgel 50 V; Trenngel 100 V) zwischen 4 und 6 h. Die Elektrophorese in den Minigelkammern (Bio-Rad) wurde bei einer niedrigeren konstanten Spannung (Sammelgel 35 V, Trenngel 90 V) durchgeführt und nach ca 2-3 h beendet. Die Gele wurden anschließend entweder direkt mit den entsprechenden Methoden (siehe unten) angefärbt oder im ungefärbten Zustand für *Western-Blot*-Analysen (3.2.6.3) weiterbehandelt.

Coomassie-Blau-Färbung für SDS-PAA Gele

Färbelösung: 0,5 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blue R250
 40 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

Die Gele wurden in der Färbelösung auf einem Schüttler über Nacht vollständig gefärbt. Dabei werden die Proteine zugleich durch die Essigsäure fixiert. Das Entfernen der nicht an Protein gebundenen Farbstoffmoleküle erfolgte bei mehrfachem Wechseln der Entfärbelösung in einem Zeitraum von 4-6 h. Durch Zugabe eines kleinen Schwamms konnten diese Zeiten verkürzt werden. Man erreicht - je nach Farbstoffbindevermögen der verschiedenen Proteine - eine Nachweisempfindlichkeit von 100 ng bis 1 µg.

Zur Konservierung konnten die Gele nach der Dokumentation auf ein in Entfärbelösung getränktes Filterpapier (GB002, Schleicher & Schuell) gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und in einem Geltdrockner unter Vakuum getrocknet werden (sukzessiv 1 h bei 80 °C und 1 h bei RT).

3.2.6.3 Protein-Blotting (*Western Blot*)

Die von Towbin et al. (1979) beschriebene *Blotting*-Technik für Proteine ermöglicht den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Polypeptide auf eine immobilisierende Membran (z.B. Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) oder Nitrocellulose- (NC-) Membran). Die auf diese Weise auf der Membranoberfläche adsorbierten Polypeptide sind nun leicht zugänglich für großmolekulare Liganden, so daß z.B. Antikörper-Antigen-Reaktionen analysiert werden können (Towbin, 1988; Hoffman et al., 1991; Carr und Scott, 1992).

Semi-Dry Blotting

Transferpuffer: 48 mM Tris
39 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol
0,04 % /w/v SDS
(pH ≈ 9,2; wurde nicht nachtitriert)

Nachdem Kyhse-Andersen (1984) eine Apparatur für den elektrophoretischen Transfer von Polypeptiden auf NC-Membranen zwischen zwei horizontal angeordneten Graphitplatten als Elektroden entworfen hatte, kam diese Methode standardmäßig zur Anwendung. Beim

Blotting mit reinen Graphitplatten ist die angelegte Spannung sehr niedrig (≤ 20 V), daher kann auf eine Kühlung verzichtet werden. Da außerdem ein sehr homogenes elektrisches Feld mit hohen Feldstärken erzeugt wird, ist der Proteintransfer gleichmäßiger, schneller und effektiver (Tovey und Baldo 1987).

Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die ungefärbten Gele zusammen mit der zuvor mit Methanol benetzten PVDF-Membran und den 5 Filterpapieren (GB004, Schleicher & Schuell) ≤ 10 min mit dem Transferpuffer äquilibriert. Das Semi-Dry-Blotting erfolgte in nachstehender Anordnung. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Komponenten luftblasenfrei zusammengesetzt werden.

- Graphit-Kathode
- 2 Lagen Filterpapier in Transferpuffer
- Gel
- PVDF-Membran
- 3 Lagen Filterpapier in Transferpuffer
- Graphit-Anode

Reversible Proteinfärbungen: Ponceau S-Färbung

Die vollständige Reversibilität dieser Färbung (Salinovich und Monteclaro, 1986) ermöglichte ihren schnellen Einsatz, um das Bandenmuster sichtbar zu machen und die Effektivität des Proteintransfers auf die PVDF-Membran beurteilen zu können. Die PVDF-Membranen wurden kurz mit Methanol benetzt und für 5 min in Ponceau S-Lösung (Serva) gefärbt. Anschließend wurden die Membranen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wieder so weit entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich vor schwachem Hintergrund zu erkennen waren. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Membranen mit TBS-Puffer (siehe 3.2.6.4) entfärbt.

3.2.6.4 Immundetektion

Die im *Western Blot* auf PVDF-Membran immobilisierten Proteine können mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (AP) bzw. der Peroxidase aus Meerrettich (HRP, *horseradish-peroxidase*) nachgewiesen, welche an die sekundären Antikörper

gekoppelt waren. Durch Zugabe von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau Tetrazolium (NBT) als Präzipitationssubstrate konnte Alkalische Phosphatase-Aktivität auf der PVDF-Membran in Form eines blauen Niederschlags sichtbar gemacht werden. Bei Verwendung der HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte die Detektion mit Hilfe des ECL-Kits von Amersham. Hier spaltet die Peroxidase H_2O_2 unter Bildung hochreaktiver Sauerstoffspezies, die ihrerseits bestimmte Chromogene (z.B. Luminol) oxidieren können. Die dabei auftretende Chemilumineszenz ist sichtbar und quantifizierbar.

TBS-Puffer (5x konz.):	100 mM Tris/HCl pH 7,6 2,5 M NaCl
Waschpuffer:	1x TBS 0,5 % (w/v) Magermilchpulver 0,1 % (v/v) Tween 20
Blockierlösung:	1x TBS 5 % (w/v) Magermilchpulver
Substratpuffer:	100 mM Tris/HCl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM $MgCl_2$
Farbreagenz für AP:	25 mg/ml NBT in 70 % DMF (Promega) 25 mg/ml BCIP in 70 % DMF (Promega)

Nach dem *Blotting* wurde die PVDF-Membran zur Kontrolle mit Ponceau S gefärbt (3.2.6.3) und anschließend wieder in TBS-Puffer entfärbt und gewaschen. Dieser und alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch durchgeführt. Das Abdecken freier Protein-Bindestellen auf der PVDF-Membran erfolgte durch 45 min Inkubation mit Blockierlösung. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer (3x 3 min) erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver/1x TBS-Puffer verdünnt). Bei Verwendung des gegen das *B. subtilis* RNase P-Protein gerichteten Antiserums „P.ab syra 6“ hat sich im Verlauf der Versuche herausgestellt, daß die Detektion unspezifischer Banden durch eine Präinkubation mit proteinreichem *E. coli*-Zellysat deutlich vermindert werden konnte. Folglich wurde dieses Antiserum mit 2 ml *E. coli* Zellysat (~11 mg

Protein/ml; $c_{\text{end}} = 0,8 \text{ mg/ml}$) in 25 ml 0,5 % (w/v) Magermilchpulver/1x TBS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur präinkubiert, bevor es mit der Membran inkubiert wurde. Nach 1,5-2 h Inkubation wurden nicht gebundene Primärantikörper mit Waschpuffer entfernt (4 Waschschrte à 5 min). Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nun die mit Alkalischer Phosphatase bzw. Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper eingesetzt. Nach 60 min Inkubation wurden nicht gebundene Sekundärantikörper durch Waschen entfernt (wie oben) und die PVDF-Membran für die entsprechenden enzymatischen Farbreaktionen vorbereitet:

Alkalische Phosphatase als Indikator

Die Membran wurde zunächst 5 min in Substratpuffer äquilibriert und die Farbreaktion anschließend durch Zugabe der chromogenen Reagenzien BCIP und NBT in einer Verdünnung von $1/_{750}$ bzw. $1/_{1500}$ in Substratpuffer gestartet. Unter ständiger Kontrolle wurde der Blot bei leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Banden in Form eines blauen Niederschlags am Ort der Enzymreaktion sichtbar wurden. Bei ausreichender Stärke der Banden wurde die Farbreaktion abgestoppt, indem die PVDF-Membran in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überführt wurde. Im Anschluß wurde die Membran luftgetrocknet und dokumentiert.

Peroxidase als Indikator

Die Membran wurde zunächst kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ getaucht. Zur Entwicklung des Blots wurde eine 1 : 1-Mischung der beiden Lösungen des ECL-Systems (jeweils 1 ml) von Amersham hergestellt und der Blot dann 60 s in dieser Substratlösung geschwenkt. Zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundreaktionen wurde der Blot kurz mit einer $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ -Spritzflasche gespült und zum Schutz des Röntgenfilms vor Feuchtigkeit in Plastikfolie eingeschlagen. Anschließend wurde der Blot für 2-20 min zur Detektion der Chemilumineszenz in einer Autoradiographiekassette auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm™-ECL™, Amersham) aufgelegt.

3.2.6.5 Expression rekombinanter Proteine in *B. subtilis*

Im Zusammenhang mit den Komplementationsanalysen war die Expression plasmidkodierter, rekombinanter Proteine erforderlich. Zur regulierten Expression von Proteinen in *B. subtilis* wurde das Expressionsplasmid pDG148 (Stragier et al., 1988) verwendet, welches unter anderem einen induzierbaren *spac*-Promotor (Yansura und Henner, 1984) trägt (Abb. 3.2). Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen sogenannten *shuttle*-Vektor, der aufgrund der beiden *origins* aus pBR322 und pUB110 sowohl in gramnegativen als auch grampositiven Bakterien repliziert wird. Durch die Gene *bla* (kodiert

β -Lactamase), *ble* (kodiert das Bleomycin-Resistenz-Protein) und *kan* (kodiert Kanamycin-Adenyltransferase) werden Ampicillin-Resistenz bei gramnegativen bzw. Bleomycin-/Kanamycin-Resistenz bei gramnegativen und grampositiven Bakterien vermittelt. Der *spac*-Promotor ist ein Hybridpromotor, bestehend aus der Promotorsequenz des *B. subtilis*-Phagen SPO-1 und der *lac*-Operator-Sequenz aus *E. coli*, die eine Bindungsstelle für den *lac*-Repressor besitzt. Der *lac*-Repressor (*lac I*) wird ebenfalls von dem Plasmid pDG148 kodiert und unter Kontrolle des konstitutiven Promotors und der Ribosomenbindestelle (*Shine-Dalgarno*-Sequenz) des Penicillinase-Gens aus *B. licheniformis* exprimiert. Im nichtinduzierten Zustand bindet der *lac*-Repressor an die *lac*-Operator-Sequenz und verhindert somit eine Transkription. Erst bei der Induktion mit dem Disaccharid Lactose oder dessen nicht-spaltbarem Derivat Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) - die sich an den Repressor anheften und seine Bindungseigenschaften so verändern, daß er von der DNA abfällt - kann die Transkription vom Promotor aus erfolgen.

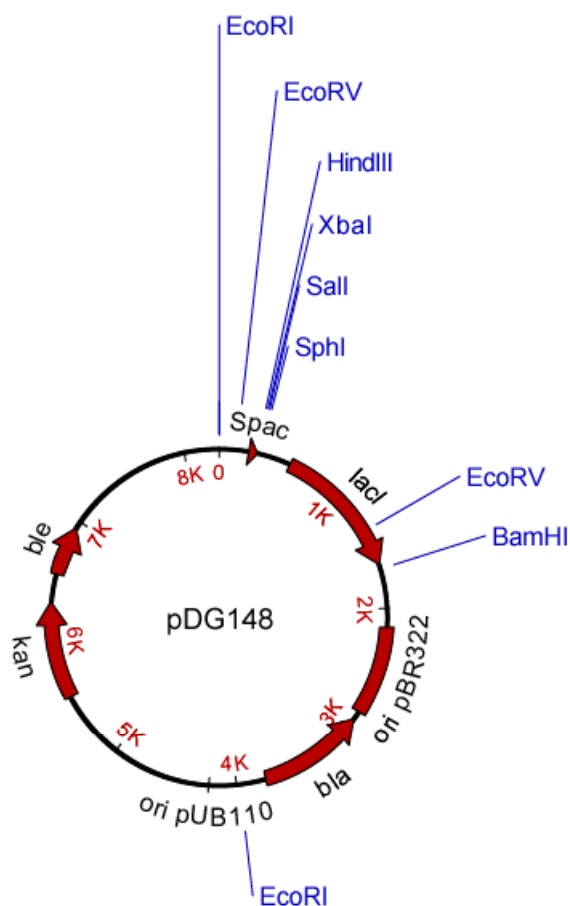


Abb. 3.2: Plasmidkarte des *shuttle*-Vektors pDG148 (erstellt mit Omega, Accelrys). Der Vektor ist eine Modifikation des Original-*spac*-Plasmids pSI1 (Yansura und Henner, 1984). Der IPTG-induzierbare *spac*-Promotor, das für den *lac*-Repressor kodierende Gen *lacI*, die Antibiotikaresistenzgene für Ampicillin (*bla*), Kanamycin (*kan*) und Bleomycin (*ble*), die beiden Replikations-*origins* sowie Positionen von relevanten Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen sind dargestellt.

Bei den Komplementationsanalysen erfolgte die Expression der plasmidkodierte, rekombinante Proteine in Abwesenheit eines Induktors (\equiv Basalexpression des *spac*-Promotors; siehe auch Diskussionsteil). Die Überexpression der rekombinanten Proteine erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, durch Induktion einer bei 37 °C angewachsenen Schüttelkultur (OD_{600} von etwa 0,6 bis 0,8) mit 1 mM IPTG. Die Zellen wurden bei 37 °C für weitere 1,5 bis 3 h inkubiert, dann durch eine zehnminütige Zentrifugation pelletiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alternativ wurde die Zellsuspension unmittelbar als Ausgangsmaterial für die Trichloressigsäure-Fällung (3.2.6.1), RT-PCR-Analyse (3.2.5.2) bzw. Aufreinigung von RNase P-Holoenzym (3.2.6.7) verwendet.

3.2.6.6 Aufreinigung von RNase P-Protein unter denaturierenden Bedingungen

TUS-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4
	100 mM NaCl
	8 M Harnstoff

Die Aufreinigung der plasmidkodierte, rekombinante Proteine erfolgte in zwei Schritten. Der erste Schritt diente der Gewinnung von Gesamtprotein aus einem Zellysat und erfolgte durch Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (3.2.6.1). Im zweiten Reinigungsgang wurde das rekombinante Protein, das mit einem Oligo-Histidin (8x bzw. 6x)-Schwanz (*His₈-tag* bzw. *His₆-tag*) ausgestattet war, schließlich selektiv mittels der Nickel-Nitrilotriacetat- (Ni^{2+} -NTA-) Metall-Affinitätschromatographie aus dem Gesamtprotein isoliert. Diese Methode beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption der Oligo-Histidin-Reste an eine Sepharosematrix-gebundene, Metall-chelatierende Gruppe (Nitrilotriacetat). Das multivalente Übergangsmetall-Ion Nickel wird hier so gebunden, daß Koordinationsbindungen für die Interaktion mit den Ringstickstoffen des Histidins zur Verfügung stehen. Die Elution erfolgte schließlich durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol, das der Seitengruppe des Histidins entspricht.

Expression von rekombinantem RNase P-Protein in *B. subtilis* (d7)

Einzelkolonien wurden in 4 ml Flüssigmedium (2 % (w/v) Xylose oder Glukose; 5 µg/ml Chloramphenicol; 20 µg/ml Kanamycin) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann in ein größeres Volumen Medium (50-100 ml) überimpft und 3-4 h bei

180 rpm und 37 °C wachsen gelassen (bis OD₆₀₀ etwa 0,6-0,8). Die Expression des rekombinanten RNase P-Proteins wurde durch Zugabe von IPTG zum Kulturmedium (1 mM IPTG Endkonzentration) induziert, woraufhin die Expression des rekombinanten Proteins für 1,5-3 h zugelassen wurde (180 rpm bei 37 °C). Zur Gewinnung des Gesamtproteins wurde anschließend eine denaturierende Trichloressigsäure-Fällung (3.2.6.1) durchgeführt. Schließlich wurde das Proteinpellet in 4-8 ml TUS-Puffer resuspendiert.

Vorbereitung der Affinitätssäule

Die Reinigung des rekombinanten Proteins aus dem Proteinpräzipitat erfolgte mittels Ni²⁺-NTA-Sepharose. Laut Hersteller besitzt 1 g Ni²⁺-NTA-Sepharose eine Bindekapazität für 5-10 mg Protein mit His₆-tag. Zuerst mußte die Ni²⁺-NTA-Sepharose gewaschen und mit dem Auftragspuffer äquilibriert werden. Dies erfolgte jeweils durch Resuspendierung in einem fünffachen Volumenüberschuß H₂O_{bidest} (einmal) und TUS-Puffer/12 mM Imidazol (dreimal) und einer anschließenden Zentrifugation ($\leq 200 \times g$). Das Säulenmaterial wurde dann 1 : 1 mit TUS-Puffer/12 mM Imidazol versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert.

Bindung des rekombinanten Proteins an die Ni²⁺-NTA-Sepharose

Das Gesamtprotein wurde zu der vorbereiteten Ni²⁺-NTA-Sepharose gegeben (Volumenverhältnis Säulenmaterial : Rohextrakt = 1 : 9) und die Endkonzentration von Imidazol wurde mit der Imidazol-Stammlösung auf 12 mM eingestellt. Diese Suspension wurde nun für 1-2 Stunden langsam bei Raumtemperatur gerührt, um die Bindung des rekombinanten Proteins an die Matrix zu ermöglichen.

Säulenlauf

Das Säulenmaterial mit dem gebundenen rekombinanten Protein wurde dann in ein leeres PD-10 bzw. Nick-Säulengehäuse mit Bodenfilter gepackt und mit einem 16-fachen Säulenbettvolumen TUS-Puffer/12 mM Imidazol gewaschen. Abschließend wurde die Sepharosematrix in einem dreifachen Säulenbettvolumen 0,5 M Imidazol in TUS-Puffer gründlich resuspendiert und mit niedriger Flußgeschwindigkeit (0,4 ml/min) die gebundene Fraktion eluiert.

3.2.6.7 Aufreinigung zellulärer RNase P-Komplexe unter nativen Bedingungen und Aktivitäts-Assay

Reaktionspuffer (5x konz.):	500 mM KCl 40 mM MgCl ₂ 50 mM HEPES pH 6,2 bzw. 7,0
Waschpuffer:	1x Reaktionspuffer 12 mM Imidazol

Die in dieser Arbeit untersuchten RNase P-Holoenzyme wurden unter nativen Bedingungen aus einem Zellysat isoliert und dann zur Bestimmung der Aufreinigungseffizienz einem Aktivitätstest unterzogen.

Aufreinigung zellulärer RNase P-Komplexe im batch-Verfahren

Das Prinzip der Aufreinigung basierte ebenfalls auf der Bindung von Histidin-markiertem rekombinantem RNase P-Protein an Ni²⁺-NTA-Sepharose. Da der Zellaufschluß unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde, sollte das RNase P-Protein im Komplex mit der RNA-Untereinheit vorliegen. Das RNase P-Holoenzym wurde nun im sogenannten *batch*-Verfahren - d.h. durch wiederholtes Resuspendieren und Pelletieren (Zentrifugation bei ≤ 200 x g) der Sepharosematrix im entsprechenden Puffer - aus dem Zellysat aufgereinigt.

Eine 50 ml-Kultur transformierter *B. subtilis*-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ≈ 0,6-0,8) wurde zur Expression der RNase P-Untereinheiten mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und weiterhin bei 37 °C/180 rpm inkubiert. Nach 90 min Expressionsdauer wurden die Zellen für 7 min bei 5.000 x g und 4 °C pelletiert. Die folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden einmal mit 50 ml 1x Reaktionspuffer gewaschen und erneut pelletiert (siehe oben). Nach Bestimmung des Naßgewichts des Zellpellets wurden die Zellen in 2 ml Reaktionspuffer aufgenommen und nachfolgend durch Ultraschallbehandlung (12 min, Pulsdauer 50 %) aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren unlöslicher Zellbestandteile für 10 min bei 15.000 x g wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) zu prä-äquilibrierter Ni²⁺-NTA-Sepharose (Volumenverhältnis Zellfraktion : Sepharosematrix = 4 : 1) gegeben und auf eine

Endkonzentration von 12 mM Imidazol eingestellt. Daraufhin wurde die Suspension zur Bindung des RNase P-Holoenzym 30-45 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Abtrennung der verbliebenen Zellbestandteile erfolgte im Anschluß durch fünf Waschschrirte mit Waschpuffer und vier Waschschrirte mit 1x Reaktionspuffer. Hierzu wurde die Sepharosematrix wiederholt in neuem Puffer (Volumenverhältnis Puffer : Sepharosematrix = 3 : 1) resuspendiert, durch Zentrifugation pelletiert ($\leq 200 \times g$) und der Überstand jeweils verworfen. Im letzten Schritt wurde die Sepharosematrix in 1x Reaktionspuffer aufgenommen (Volumenverhältnis 1 : 1). Die noch an der Sepharosematrix gebundenen RNase P-Komplexe wurden dann unmittelbar hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität untersucht.

Aktivitäts-Assay

Die noch über die Histidinreste des RNase P-Proteins an der Sepharosematrix gebundenen Ribonukleoprotein-Komplexe wurden mit vorbereiteter 5'-markierter prä-tRNA^{Gly} inkubiert. Die Substratkonzentration im Reaktionsansatz betrug 100 nM. Durch die Entnahme von Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließende PAA-Gelanalyse wurde der Verlauf der Reaktion dokumentiert.

Die für den Spaltungs-Assay verwendete prä-tRNA^{Gly} wurde nach einer standardisierten Präinkubationsmethode behandelt, um die Ausbildung bindungskompetenter Konformationen sicherzustellen. Dazu wurde die RNA (1 pmol prä-tRNA^{Gly}/μl in 1x Reaktionspuffer; 5' ³²P-prä-tRNA^{Gly} : prä-tRNA^{Gly} = 1 : 20) vor Zugabe zum Reaktionsansatz für 5 min bei 55 °C und anschließend für 25 min bei 37 °C inkubiert.

Die Prozessierungsreaktion wurde durch die Zugabe der prä- tRNA^{Gly} gestartet und bei 37 °C unter schwachem Schütteln durchgeführt. Der Reaktionsansatz war insgesamt aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

5,0 μl Reaktionspuffer (5x konz.)

5,0 μl Substrat (≈12.500 cpm) in 1x Reaktionspuffer

20,0 μl Sepharosematrix-/RNase P-Komplex in 1x Reaktionspuffer

20 μl H₂O_{bidest}

Nach 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min und 30 min wurden jeweils 8 μl-Aliquots entnommen, zum Abstoppen der Prozessierungsreaktion sofort mit 1 Volumen RNA-Probenpuffer (3.2.3.2) versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Analyse der Proben erfolgte durch den Auftrag auf ein 10 % PAA-Gel (3.2.3.2), wodurch die

ungespaltene prä-tRNA^{Gly} vom abgespaltenen 5'-Terminus (Flanke, 14 nt lang) getrennt wurde. Die Banden wurden mit Hilfe des Bio-Imaging Analyzers FLA-3000 (Fujifilm) sichtbar gemacht und quantifiziert. Der Substratumsatz zu einem bestimmten Zeitpunkt t wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Spaltung} = \frac{\text{PSL}_{(\text{Flanke})}}{\text{PSL}_{(\text{Flanke})} + \text{PSL}_{(\text{prä-tRNA})}} \times 100$$

PSL = photostimulierte Lumineszenz (Standard des Bio-Imaging Analyzers FLA-3000 Systems, Fujifilm)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Konstruktion und Charakterisierung einer *B. subtilis*-Mutante mit inhibierbarer *rnpA*-Genexpression

Die genomische Organisation der Gene in der *rnpA*-Region ist in vielen der bislang charakterisierten Bakterien vergleichbar. Häufig liegt das für das RNase P-Protein (P-Protein) kodierende *rnpA*-Gen unmittelbar stromabwärts des *rpmH*-Gens, welches für das ribosomale Protein L34 kodiert. Zudem befindet sich diese Region häufig in der Nähe des chromosomalen Replikationsursprungs. In *E. coli* bilden *rpmH* und *rnpA* eine Transkriptionseinheit (Hansen et al., 1985), deren Expression mutmaßlich von zwei Promotoren vor dem *rpmH*-Gen reguliert wird (Hansen et al., 1982; Panagiotidis et al., 1992). In *Bacillus subtilis* scheinen beide Gene ebenfalls koordiniert als Operon exprimiert zu werden - vor dem *rpmH*-Gen konnten zwei Promotoren identifiziert werden. Im sequenzierten Genom von *B. subtilis* (Kunst et al., 1997) ist – wie in anderen Bakterien - eine Kopie des *rnpA*-Gens vorhanden.

Zur Konstruktion der *B. subtilis*-Mutante mit inhibierbarer *rnpA*-Genexpression wurde das native *rnpA*-Gen durch homologe Rekombination gegen ein *rnpA*-Gen mit regulierbarem Promotor ausgetauscht. Als Promotorsequenz wurde der induzierbare Xylose-Promotor (*xyl*-Promotor/ P_{xyl}) aus *B. subtilis* W23 verwendet, der durch den Xylose-Repressor (*xyl*-Repressor) reprimiert wird. Durch die Integration der $P_{xyl}::rnpA$ -Genfusion in das Chromosom von *B. subtilis* konnte so ein Stamm mit inhibierbarer *rnpA*-Genexpression generiert werden. Die entsprechend modifizierte chromosomale Region wurde mit Hilfe von PCR- und *Southern Blot*-Analysen verifiziert und die Transkriptionstärke von *rnpA* im induzierten bzw. reprimierten Zustand mittels RT-PCR untersucht. Wachstumsanalysen mit dem konstruierten *B. subtilis*-Stamm gaben schließlich Aufschluß darüber, ob das *rnpA*-Gen für ein essentielles Genprodukt kodiert.

4.1.1 Konstruktion der Genfusion zwischen dem Xylose-Promotor und dem *rnpA*-Gen

Da eine effiziente Hemmbarkeit der *rnpA*-Genexpression für die Konstruktion des *Bacillus*-Stammes maßgebend war, sollte das chromosomale Gen unter die Kontrolle des

xyl-Promotors gestellt werden. In *B. subtilis* reguliert der *xyl*-Promotor des Xylose-Operons die Transkription der Gene *xylA* und *xylB*, welche für die Xylose-Isomerase und Xylulokinase kodieren. Beide Proteine werden beim Xylose-Stoffwechsel - der Isomerisierung von Xylose zu Xylulose and der anschließenden Phosphorylierung zu Xylulose-5-Phosphat - benötigt. Das Xylose-Operon ist ein gut charakterisiertes System zur stringenten Regulation der Genexpression in *B. subtilis*. Die an der Regulation beteiligten Elemente sind der *xyl*-Promotor, die Xylose-Operatoren und das von *xylR* kodierte *xyl*-Repressor-Protein (Wilhelm und Hollenberg, 1984, 1985; Gärtner et al., 1988; Kreuzer et al., 1989; Rygus et al., 1991; Dahl et al., 1994). Das *xyl*-Repressor-Protein bindet im nicht-induzierten Zustand an die Operator-Sequenzen und verhindert dadurch die Initiation der Transkription am *xyl*-Promotor. In Gegenwart des Induktors Xylose wird dieser Repressor inaktiviert. Xylose bindet an das Repressor-Protein, welches dadurch seine Bindungseigenschaften ändert und von den Operator-Sequenzen dissoziiert. Durch diesen Mechanismus wird die Transkription vom *xyl*-Promotor aus induziert.

Ferner ist im Xylose-Operon eine durch Glukose vermittelte Katabolitrepression wirksam. Durch diesen übergeordneten Regulationsmechanismus wird in Gegenwart des leicht metabolisierbaren Substrats Glukose die Expression von Genen reprimiert, deren Produkte am Abbau von sekundären Kohlenstoffquellen beteiligt sind. Vermittelt wird dieser Mechanismus durch eine 14 Bp lange CRE (*cis-response element*)-Sequenz im kodierenden Bereich von *xylA*, durch das DNA-bindende Protein CcpA (*catabolite control protein A*) sowie das HPr-Protein, einer Komponente des Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase-Systems (PTS) (Henkin 1996; Fujita et al. 1996). Weitere Studien haben gezeigt, daß auch XylR an der Glukose-Repression beteiligt ist. Hierbei interagiert Glukose-6-Phosphat mit dem XylR-Repressor und funktioniert auf diese Weise als Anti-Induktor. Folglich ist der letztgenannte Regulationsmechanismus unabhängig von CRE (Kraus et al., 1994; Dahl et al., 1995).

Die in Abbildung 4.1 dargestellte Regulatorregion des Xylose-Operons beinhaltet die -10 Box und die -35 Box der Promotorregion, die eine große Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz des $\sigma^{43 (=A)}$ -Promotors besitzen (Moran et al., 1982). Zusätzlich enthält die Promotorregion eine starke Anhäufung von Adenin-Nukleotiden in der -43-Region (A-Block), welche die Aktivität des Promotors stark erhöht. So haben Expressionsstudien gezeigt, daß es sich bei diesem Promotor um ein starkes Transkriptionsstartsignal handelt (Gärtner et al., 1988). Durch Deletion des adeninreichen Sequenzabschnitts kommt es zu einer Abnahme der Promotorstärke um etwa 97 %.

<u>EcoR I</u>				
TGAATTCCTTA	AGTATTTCTT	TTAATAATAA	CTTTTGATT	ACTTTTTTTGA
CAAAGGTTTG	ATCTGCGATA	TCCACTTCAT	CCACTCCATT	TGTATAACCT
TTAAATTAAG	TTAAAATTTT	TTGTGTTTCA	TATGAGATT	AGTACATAGC
GAATCTTACC	TTTATTATAT	CTAATGTGTT	CATG	A-Block AAAAAC TAAAAAAAT
- 35	< 17 Bp >	- 10	+1	<Operatorsequenz>
ATTGAAAATA	CTGATGAGGT	TATT	TAAA	ATAAGT TAGTTTGTTT
<Operatorsequenz>				
GGGCAACAAA	CTAATGTGCA	ACTTACTTAC	AATATGACAT	AAAATGCATC
TGTATTTGAA	TTTATTTT	Shine-Dalgarno AGGAGGAAAT	Startcodon AAC	ATGGCTC AATCTCATTC
TAGTTCAGTT	AACTATTTTG	GAAGCGTAAA	CAAAGTGGTT	TTCGAAGGGA
<u>Hind III</u>				
AAGCTT				

Abb. 4.1: Promotor-Operator-Region des Xylose-Operons. Dargestellt ist die 5' → 3'-Sequenz des 406 Bp langen EcoR I/Hind III-Fragments aus dem Plasmid pWH418, welches die gesamte Promotor-Operator-Region des Xylose-Operons aus *B. subtilis* W23 umfaßt (Gärtner et al. 1988; Kreuzer et al. 1989). Die Promotor-Region (-35 Box, 17 Bp langer Zwischenbereich, -10 Box), die adeninreiche Verstärkerregion (A-Block), der Transkriptionsstartpunkt (+1), die palindromischen durch 5 Bp getrennten Operator-Sequenzen, die *Shine-Dalgarno*-Sequenz und das Translationsstartkodon ATG des Xylose-Isomerase-Gens (*xylA*) sind angegeben.

Ein 1,57 kBp langes Nae I/Sal I-Fragment aus dem Vektor pWH418 (Gärtner et al. 1988) wurde in einen mit EcoR V/Sal I geschnittenen pBSIIS(+)-Vektor (Stratagene) kloniert. Dieses als pN/S13 bezeichnete Plasmid wurde von R. Kretschmer-Kazemi Far (Institut für Molekulare Medizin; Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt. Auf dem insertierten Fragment liegt die vollständige Promotor-Operator-Region des Xylose-Operons aus *B. subtilis* W23 und ein kurzer Teil des Xylose-Isomerase-Strukturgens (*xylA*). Ferner wird das Xylose-Operon am 5'-Ende von einem Chloramphenicolresistenz-Gen (*cam*) mit Promotor aus dem *Bacillus/Staphylococcus*-Klonierungsvektor pC194 flankiert. Die Transkriptionsrichtungen der beiden Gene sind entgegengesetzt. Aus diesem Vektor wurde eine *xyl*-Promotor-Chloramphenicol-Kassette (P_{xyl} -*cam*-Box) mit den für diese Arbeit benötigten Restriktionsschnittstellen hergestellt. Mittels *Primer*-gerichteter Mutagenese mußten hierfür in zwei sequentiellen Klonierungsschritten Restriktionsschnittstellen an den Enden der Kassette generiert bzw. eliminiert werden, welche die Insertion der Kassette vor das *rnpA*-Gen ermöglichen sollten (siehe Abbildung 4.2).

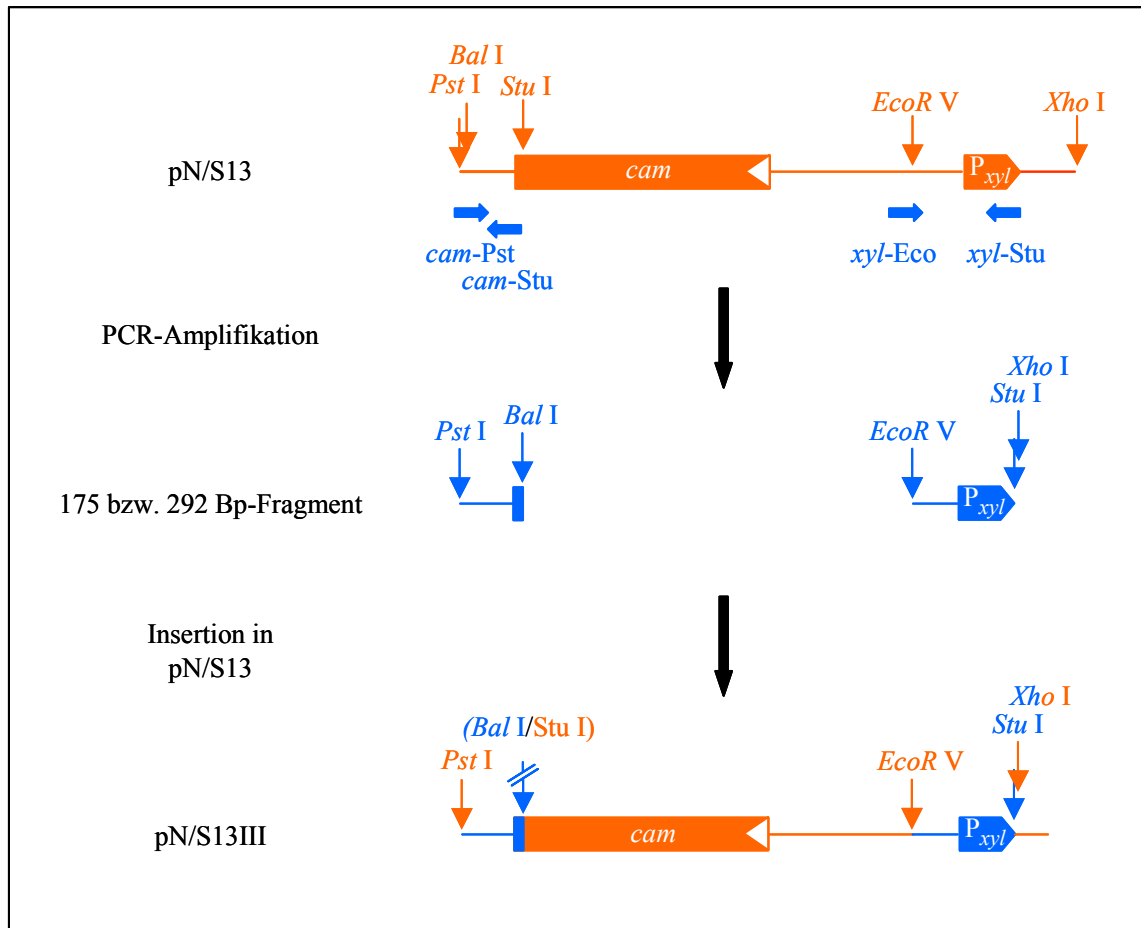


Abb. 4.2: Einfügen bzw. Eliminieren von Restriktionserkennungssequenzen in die Xylose-Promotor-Chloramphenicol-Kassette. Gezeigt ist der Sequenzabschnitt mit dem Chloramphenicol-Resistenzgen (*cat*) und dem Xylose-Promotor (*P_{xyl}*) vor und nach der *Primer*-gerichteten Mutagenese in Plasmid pN/S13 bzw. pN/S13III. Mit den *Primer*-Paaren (horizontale Pfeile in Blau) *cam*-*Pst* und *cam*-*Stu* sowie *xyl*-*Eco* und *xyl*-*Stu* amplifizierte und in pN/S13 insertierte Fragmente (\Rightarrow pN/S13III) sind in blauer Farbe dargestellt. In pN/S13 vorhandene Schnittstellen (vertikale Pfeile in Orange) und mittels der *Primer*-Paare generierte Schnittstellen (vertikale Pfeile in Blau) sind markiert.

Im ersten Schritt wurde mit den *Primern* *cam*-*Pst* und *cam*-*Stu* ein 175 Bp-Fragment aus der 3'-Region des auf Plasmid pN/S13 lokalisierten *cam*-Gens amplifiziert. Dabei wurde mittels *cam*-*Pst* die stromabwärts des *cam*-Gens gelegene *Bal* I-Restriktionserkennungssequenz eliminiert und mittels *cam*-*Stu* die im 3'-Bereich des *cam*-Gens liegende *Stu* I- zu einer *Bal* I-Erkennungssequenz mutiert. Durch Restriktionsspaltung des mutierten PCR-Fragments mit *Bal* I (generiert glatte Enden) und *Pst* I konnte die entsprechende Region von pN/S13 – die mit *Stu* I (generiert glatte Enden) und *Pst* I herausgeschnitten worden war – ersetzt werden. Nach der Transformation des Ligationsproduktes in *E. coli* (3.2.2.1) wurden aus 12 Klonen Plasmide isoliert und durch eine Restriktionsanalyse untersucht. Hiervon zeigten die Plasmide aus 11 Klonen das erwartete Restriktionsmuster.

Das entstandene Plasmid pN/S13 II des im weiteren Verlauf verwendeten Klons 12 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Für die Insertion der P_{xyl} -*cam*-Box vor das *rnpA*-Gen mußte im zweiten Schritt eine Restriktionsschnittstelle unmittelbar stromabwärts der *Shine-Dalgarno*-Sequenz des *xyl*-Promotors generiert werden. Die Mutagenese wurde durch die PCR-Amplifizierung eines 292 Bp-Fragments von Plasmid pN/S13 mit dem *Primer*-Paar *xyl*-Eco/*xyl*-Stu erzielt. Mit dem Mutagenese-*Primer* *xyl*-Stu wurde dabei eine Stu I- und eine Xho I-Restriktions-Erkennungssequenz generiert. Der entsprechende Sequenzabschnitt auf pN/S13 II konnte nun über die Schnittstellen Xho I und EcoR V gegen dieses modifizierte Fragment ausgetauscht werden. Ein Kontroll-Restriktionsverdau mit EcoR V/Xho I war bei jedem der 10 isolierten Klone positiv. Die dementsprechend umgestaltete P_{xyl} -*cam*-Box in pN/S13 III wurde durch Sequenzierung überprüft und konnte für den nächsten Klonierungsschritt verwendet werden.

4.1.2 Konstruktion von Vektoren zur Integration der $P_{xyl}::rnpA$ -Genfusion ins Chromosom von *B. subtilis* YB886

Die in dem *B. subtilis*-Stamm 168 residenten Prophagen PBSX und SP β wurden in dem *B. subtilis*-Stamm YB886 inaktiviert bzw. eliminiert (Yasbin et al., 1980). Durch die *xin-1*-Mutation ist PBSX nicht mehr induzierbar und SP β - der nachweislich das induzierbare DNA-Modifikationssystem in *B. subtilis* kontrolliert - wurde vollständig aus YB886 eliminiert. Dadurch wurde in diesem Stamm die Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien - welche den Prophagen PBSX induzieren - reduziert. Der Stamm YB886 wurde für die Konstruktion der Mutante verwendet.

Zur Herstellung der *B. subtilis*-Mutante war geplant, das native, chromosomale *rnpA*-Gen durch homologe Rekombination gegen die P_{xyl} -*rnpA*-Genfusion auszutauschen. Hierfür wurde ein Vektor konstruiert, der ein mit der P_{xyl} -*cam*-Box fusioniertes *rnpA*-Gen trägt. Als Integrationsvektor mußte ein Plasmid verwendet werden, welches in *B. subtilis* nicht replikationsfähig ist.

Bei der Konstruktion des Integrationsvektors wurden zudem folgende Erkenntnisse berücksichtigt: (1) Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, befindet sich auf dem intergenischen Abschnitt zwischen dem *rpmH*-Gen und dem *rnpA*-Gen eine Sequenzfolge, bei der die transkribierte RNA potentiell zwei Haarnadelstrukturen (*hairpins*) ausbilden kann. Der Sequenz für den potentiell ersten *hairpin* stromabwärts von *rpmH* (L1 in Abb. 4.3) ist eine Oligo(T)₆-Sequenz nachgeschaltet, so daß hier alle für ein intrinsisches Transkriptions-

Terminationssignal charakteristischen Elemente vorhanden sind (d'Aubenton-Carafa et al., 1990). Dieses Terminationssignal könnte folglich einen Regulationsmechanismus darstellen, um in diesem Operon die Transkriptionsrate des *rnpA*-Gens gegenüber der des *rpmH*-Gens zu reduzieren: aufgrund der Ausbildung der Terminationsschleifen würde nur ein geringerer Anteil aller vor dem *rpmH*-Gen initiierten Transkriptionsereignisse auch zur Expression des *rnpA*-Gens führen. (2) Das *rpmH*-Gen weist ein AUG-Startkodon und das *rnpA*-Gen ein GUG-Startkodon auf. *B. subtilis* verwendet die drei Startkodons AUG, UUG und GUG. Vergleicht man die Protein-Syntheserate von Genen mit AUG oder GUG-Startkodons, so ist das AUG-Startkodon bei der Proteinexpression 3- bis 5-fach effektiver (Vellanoweth und Rabinowitz 1992). (3) Vor dem Startkodon des *rnpA*-Gens konnte keine *Shine-Dalgarno*-Sequenz identifiziert werden. Solch eine Ribosomenbindestelle liegt hingegen 7 Nukleotide vor dem Startkodon des *rpmH*-Gens. Dies könnte ebenfalls dazu führen, daß die Gene in dem Operon unterschiedlich stark exprimiert werden. (4) Für *E. coli*-Zellen wurde berechnet, daß gegenüber der RNase P-RNA ein ca 60-100-facher Überschuß an Ribosomen vorhanden ist (Dong et al., 1996). Bei einem entsprechenden Verhältnis von Ribosomen zu RNase P-Holoenzymen sollte - wenn von einer vergleichbaren Stabilität der Proteine ausgegangen wird - die Expressionsrate des ribosomalen Proteins L34 (kodiert von *rpmH*) demzufolge auch entsprechend größer sein als die des RNase P-Proteins. Beide Gene sind jedoch Bestandteil des gleichen Operons und ihre Transkription wird von dem/den gleichen Promotor(en) reguliert (Hansen et al., 1985). (5) In Abhängigkeit von der Wachstumsphase wurde eine Kopienzahl von 200 (Vioque et al., 1988) bzw. 80-1000 (Dong et al., 1996) RNase P-Molekülen pro *E. coli*-Zelle berechnet. Für *B. subtilis* wurde eine RNase P-RNA Kopienzahl von 30-50 (Reich et al., 1986) bzw. 200 (Barrera und Pan, 2004) pro Zelle angegeben. Folglich ist die Konzentration an intrazellulärem RNase P-Enzym relativ niedrig. (6) Eine Überexpression des RNase P-Proteins in *E. coli* ist toxisch für die Zellen (Gopalan et al., 1997).

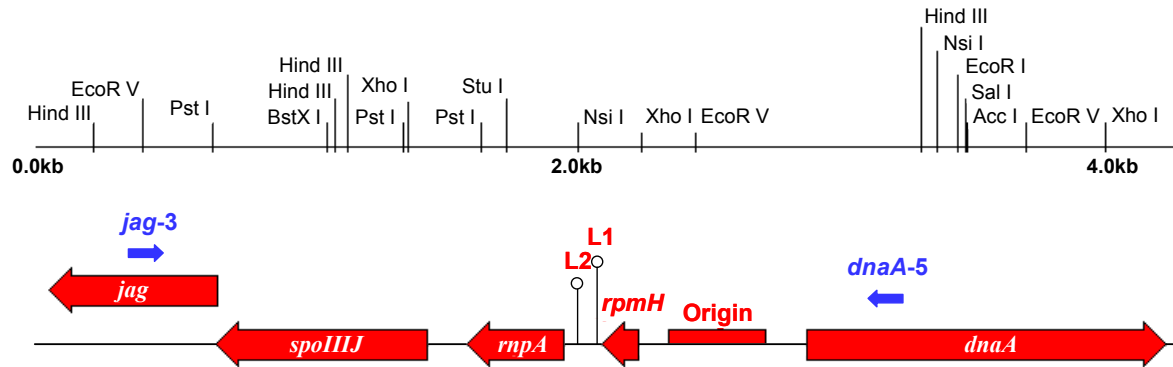


Abb. 4.3: Restriktionskarte der chromosomalen *rnpA*-Region von *B. subtilis*. Die Positionen der Gene für Spo IIIJ-assoziiertes Protein (*jag*), vegetativ exprimiertes Sporulationsprotein (*spoIIIJ*), RNase P-Protein (*rnpA*), ribosomales Protein L34 (*rpmH*) und Replikations-Initiator-Protein (*dnaA*) sind dargestellt. L1 und L2 markiert Bereiche, an denen die transkribierte RNA potentiell *hairpin-loops* ausbilden kann. Ferner ist ein Sequenzbereich gekennzeichnet, der den Replikations-*origin* von *B. subtilis* darstellt. Mit den Primern *jag-3* und *dnaA-5* wurde ein chromosomales 2,73 kbp-Fragment von *B. subtilis* YB886 amplifiziert, welches das *rnpA*-Gen enthält.

Diese Befunde gaben Anlaß dazu, bei der Konstruktion des Integrationsvektors zwei verschiedene Strategien zu verfolgen. In Konstrukt I wurde das *rnpA*-Gen direkt unter die Kontrolle des reprimierbaren *xyl*-Promotors gestellt (Integrationsvektor pS). Da der induzierte *xyl*-Promotor - wie bereits erwähnt - ein starkes Transkriptionssignal darstellt, sollte in diesem Fall das *rnpA*-Gen stark exprimiert werden. Der Einfluß einer derart erhöhten *rnpA*-Expressionsrate auf die Lebensfähigkeit der *B. subtilis*-Zellen konnte aufgrund der in *E. coli* gemachten Beobachtungen zunächst nicht eingeschätzt werden. Bei der Konstruktion des zweiten Plasmids wurde berücksichtigt, daß im *rpmH-rnpA*-Operon offensichtlich Regulationsmechanismen existieren, die eine unterschiedliche Expressionsrate der Gene bewirken. So ist es denkbar, daß durch die intergenische Sequenz zwischen dem *rpmH*- und *rnpA*-Gen bzw. die Umgebung und Identität der Startkodons das P-Protein schwächer exprimiert wird als das L34-Protein. Dem Rechnung tragend wurde in Konstrukt II zwischen *xyl*-Promotor und *rnpA*-Gen zusätzlich das *rpmH*-Gen mit der intergenischen Sequenz insertiert (Integrationsvektor pD). Demzufolge sollte die *rnpA*-Expressionsrate bei der Genanordnung in Vektor pD niedriger sein als bei der auf Vektor pS.

In der von D. Gärtner beschriebenen *xyl*-Promotor-Sequenz von *B. subtilis* liegen zwischen der *Shine-Dalgarno*-Sequenz und dem *xylA*-Startkodon 7 Nukleotide (Gärtner et al., 1988). Da der Abstand und die Basenpaarzusammensetzung zwischen der *Shine-Dalgarno*-Sequenz und dem Startkodon einen Einfluß auf die Translations-Initiations-Effizienz haben kann (Shepard et al., 1982; Gold, 1988; Chen et al., 1994), wurde sowohl der Abstand als auch die Nukleotidsequenz bei der Konstruktion des Integrationsvektors dem nativen *xyl*-Promotor angepaßt.

Zunächst wurde ein 2,73 kBp-Fragment, welches das *rnpA*-Gen enthält, mit den *Primern* *jag-3* und *dnaA-5* von chromosomaler DNA aus *B. subtilis* YB886 PCR-amplifiziert (Abb. 4.3). Die das *rnpA*-Gen flankierenden Sequenzen 5' bzw. 3' der Genfolge *rpmH-rnpA* waren für die anschließende homologe Rekombination wichtig. Die Klonierung dieses Fragments erwies sich jedoch als schwierig. So war die Transformationseffizienz sehr niedrig und bei den aus den wenigen Transformanten isolierten Plasmiden fanden – wie anhand von Restriktionsanalysen festgestellt werden konnte – Sequenzumlagerungen statt. Daher mußten verschiedene chemisch-kompetente *E. coli*-Stämme, Vektoren und Klonierungsstrategien ausgetestet werden. Erfolgreich war letztendlich eine *blunt-end*-Ligation des 2,73 kBp-Fragments in mit *Sma* I linearisierten pSP64-Vektor (Promega) und die anschließende Transformation in chemisch-kompetente XL-2 Blue-Zellen (Stratagene). Von den isolierten Klonen wurden analytische Plasmidpräparationen angefertigt und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Nur bei ¼ der isolierten Klone entsprach das Restriktionsmuster dem theoretisch erwarteten.

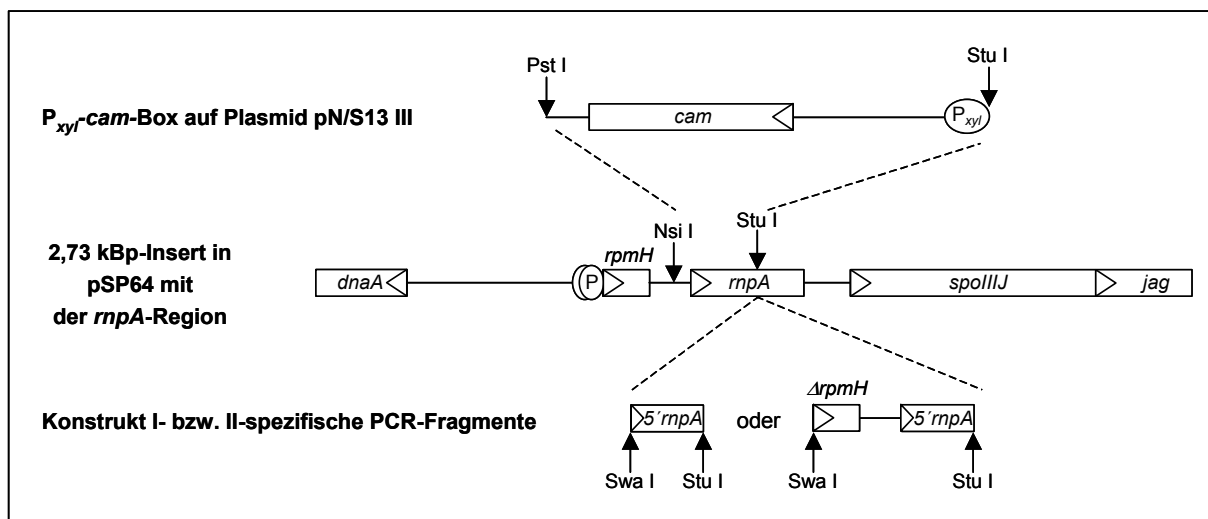


Abb. 4.4: Strategie zur Konstruktion der Integrationsvektoren. Im ersten Klonierungsschritt wurde die *P_{xyl}-cam-Box* aus Plasmid pN/S13 III über die gekennzeichneten Restriktionsenzym-Schnittstellen in die *rnpA*-Region integriert. Für Konstrukt I bzw. Konstrukt II wurden mit den *Primern* Linker-*Stu*/Linker-solo bzw. Linker-*Stu*/Linker-duo die entsprechenden Fragmente aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* YB886 PCR-amplifiziert und im zweiten Klonierungsschritt zur Komplettierung der Konstrukte über die angegebenen Schnittstellen vor den *xyl*-Promotor inseriert. Senkrechte Pfeile markieren die Positionen der für die Klonierung relevanten Schnittstellen; ebenfalls angegeben ist die Transkriptionsrichtung (Pfeilspitze in den Boxen) der Gene *cam*, *dnaA*, *jag*, *rnpA*, *rpmH* und *spoIIIJ*. Der charakterisierte Tandem-Promotor (P) des *rpmH-rnpA*-Operons ist dargestellt.

Die Integration der *P_{xyl}-cam-Box* stromaufwärts des *rnpA*-Gens erfolgte über zwei aufeinanderfolgende Klonierungsschritte (Abb. 4.4).

Die modifizierte *P_{xyl}-cam-Box* in Plasmid pN/S13 III wurde über die Schnittstellen *Stu* I und *Pst* I herausgeschnitten. Das 1,42 kBp lange Fragment wurde nun über die

Restriktionsschnittstellen *Stu* I und *Nsi* I (besitzt komplementäre Enden zu *Pst* I) in die *rnpA*-Region auf Plasmid pSP64 inseriert. Dadurch wurde ein 0,26 kbp-Bereich, der die 5'-Region des *rnpA*-Gens enthält, deletiert. Eine Restriktionsanalyse zeigte, daß nur ¼ der isolierten Transformanten ein Plasmid mit der beabsichtigten Sequenzanordnung trug.

Im zweiten Klonierungsschritt mußte der zuvor deletierte 5'-Bereich des *rnpA*-Gens wieder über die *Stu* I-Schnittstelle in das Konstrukt inseriert und das *rnpA*-Gen auf diese Weise repariert werden. Zur Fertigstellung der beiden Integrationsvektoren wurden von genomischer *B. subtilis* YB886-DNA zwei unterschiedliche Fragmente für Konstrukt I und Konstrukt II PCR-amplifiziert. Damit der Sequenzabschnitt zwischen der *Shine-Dalgarno*-Sequenz und dem Startkodon des *xyl*-Promotor-regulierten Gens mit dem des nativen *xyl*-Promotors übereinstimmt, mußte unmittelbar stromaufwärts des *rnpA*- bzw. *rpmH*-Startkodons zusätzlich ein mit einer Restriktionserkennungssequenz versehenes DNA-Verbindungsstück angefügt werden. Dies erfolgte mit den *PCR-Primern* Linker-solo bzw. Linker-duo, die am 5'-Ende des jeweiligen Gens eine Oligonukleotidsequenz mit einer *Swa* I-Erkennungssequenz generierten. Durch Restriktionsspaltung mit *Swa* I entstand auf diese Weise am jeweiligen Startkodon eine 7 Nukleotide lange Extension. Die Herstellung des Integrationsvektors pS, bei dem das *rnpA*-Gen direkt unter der Kontrolle des *xyl*-Promotors steht, erfolgte durch PCR-Amplifikation eines 230 bp-Fragments mit den *Primern* Linker-*Stu* und Linker-solo. Mit diesem *Primer*-Paar wurde der 5'-Bereich des *rnpA*-Gens amplifiziert. *Primer* Linker-*Stu* umfaßte die *Stu* I-Erkennungssequenz im *rnpA*-Gen, Linker-solo generierte die zuvor beschriebene Verbindungssequenz und die *Swa* I-Erkennungssequenz direkt 5' des *rnpA*-Startkodons. Zusätzlich wurde das ursprüngliche GUG-Startkodon von *rnpA* mittels dem *Primer* Linker-solo zu dem effizienteren AUG-Startkodon mutiert. Zur Konstruktion des Integrationsvektors pD wurde mit den *Primern* Linker-*Stu* und Linker-duo ein 507 bp-Fragment PCR-amplifiziert, welches die 5'-Region des *rnpA*-Gens, das *rpmH*-Gen mit der intergenischen Region und die Verbindungssequenz mit der *Swa* I-Erkennungssequenz enthielt. Hier wurde das natürliche GUG-Startkodon von *rnpA* belassen. Die Fertigstellung der Integrationsvektoren pS bzw. pD erfolgte abschließend durch Integration des jeweiligen PCR-Fragments – nach Restriktionsspaltung mit *Stu* I und *Swa* I (beide Enzyme generieren glatte Enden) - in das mit *Stu* I-linearisierte Konstruktionsplasmid. Bei diesem Klonierungsschritt mit zwei glatten Enden konnten die DNA-Fragmente in unterschiedlicher Orientierung in das Plasmid integriert werden. Durch eine analytische Restriktionsspaltung konnte die Orientierung des im Integrationsvektor inserierten Fragments bestimmt werden. Im Fall der Transformation von *E. coli* (DH5α) mit dem pS-Konstrukt war das Fragment bei ¼ der analysierten Transformanten in der gewünschten Orientierung im Plasmid inseriert. Die Sequenz des Plasmids aus Klon 2 konnte daraufhin mittels Sequenzierung verifiziert werden. Für die Herstellung der *B. subtilis*-Mutante mit dem

ins Chromosom integrierten Konstrukt I wurde dieses als pS2.1 bezeichnete Plasmid verwendet (\Rightarrow Integrationsvektor pS2.1; siehe Abb. 4.5). Nur ein Klon von den mit pD transformierten DH5 α -Zellen enthielt ein Plasmid, bei dem das Fragment in der geforderten Orientierung inseriert war (\Rightarrow Integrationsvektor pD2b; siehe Abb. 4.5).

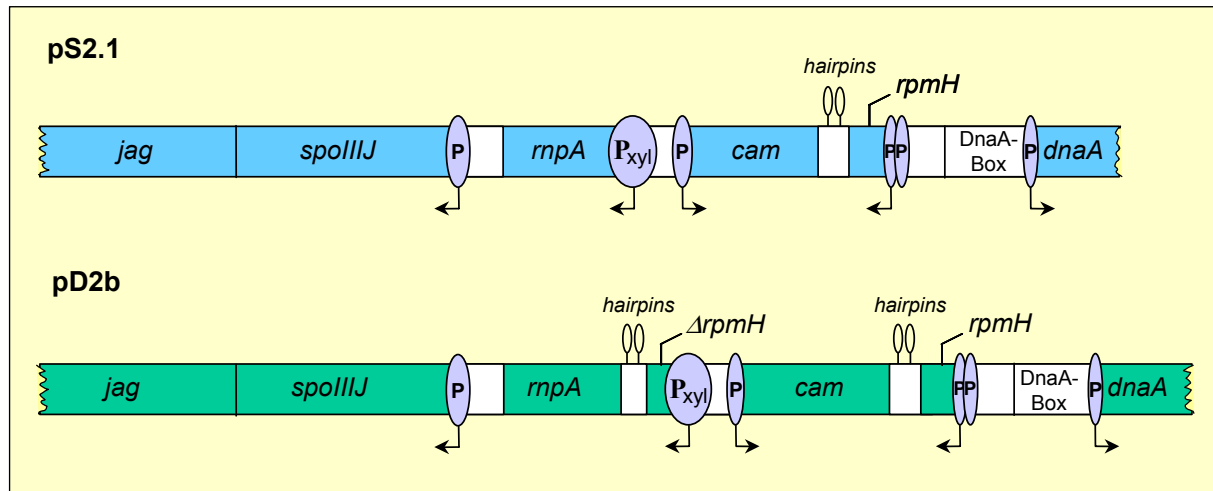


Abb. 4.5: Darstellung der Integrationsvektoren pS2.1 (Konstrukt I) und pD2b (Konstrukt II). Gezeigt ist die jeweilige in den Vektor pSP64 insertierte Genregion mit den Genen *jag*, *spoIIIJ*, *rnpA*, *rpmH*, *cam* und *dnaA*. Ferner sind die Transkriptionsrichtung (Pfeile) der charakterisierten Promotoren (P) bzw. des induzierbaren *xyl*-Promotors (P_{xyl}) sowie die Lage der potentiellen Haarnadelstrukturen (*hairpins*) schematisch dargestellt. Der Sequenzabschnitt des Replikations-*origin* wird durch die DnaA-Box gekennzeichnet. Das unter der Kontrolle des *xyl*-Promotors stehende *rpmH*-Gen von pD2b weist im 5'-Bereich eine Leserastermutation auf und ist folglich ein nicht-funktionelles Gen.

Die Sequenzierung des Integrationsvektors pD2b (Konstrukt II) ergab, daß im 5'-Bereich des *rpmH*-Gens, welches unter der Kontrolle des *xyl*-Promotors steht, ein 5 Bp langer Abschnitt deletiert war. Bezogen auf den Transkriptionsstart des *xyl*-Promotors handelte es sich hierbei um die Sequenz AAGAA an Position +105 bis +110. Die dadurch verursachte Verschiebung des Leserasters führte dazu, daß das 7. und 9. Kodon in UAA (*ochre*)-Stopkodons umgewandelt wurden. Folglich sollte von dem ursprünglichen *rpmH*-Gen nur ein Penta-Peptid mit der Aminosäuresequenz Met-Asn-Ile-Pro-Thr-Glu translatiert werden können. Das native *rpmH*-Gen war jedoch nach wie vor stromabwärts des *cam*-Gens vorhanden, so daß funktionelles L34-Protein auch nach erfolgter homologer Rekombination in der *B. subtilis*-Mutante exprimiert werden konnte. Da es bei Konstrukt II infolge der Deletion zum vorzeitigen Translationsabbruch bei dem zusätzlichen *xyl*-Promotor-regulierten *rpmH*-Gen kommt, war zu erwarten, daß die *rpmH*-Expressionsrate in dem rekombinanten Stamm vergleichbar mit der des YB886-Stammes ist. Effekte einer erhöhten *rpmH*-Expressionsrate aufgrund zweier Genkopien konnten somit ausgeschlossen werden.

Beide Integrationsvektoren - p2.1 und pD2b - erwiesen sich in den *E. coli* (DH5 α)-Zellen als strukturell instabil. Die Kulturen wurden daher ausschließlich mit zuvor vereinzelter Zellklonen angeimpft und die Plasmidpräparationen wurden regelmäßig detaillierten Restriktionsanalysen unterzogen.

4.1.3 Chromosomale Integration der P_{xyI}::*rnpA*-Genfusionen in *B. subtilis*

Die konstruierten Integrationsvektoren pS2.1 und pD2b enthielten jeweils die regulierbare P_{xyI}::*rnpA* bzw. P_{xyI}::(Δ *rpmH*::*rnpA*)-Genfusion, ein *cam*-Gen für die spätere Selektion der rekombinanten *B. subtilis*-Zellen und flankierend Sequenzen des *jag*-, *spoIIIJ*- und *dnaA*-Gens für die gerichtete Integration der Konstrukte ins Chromosom von *B. subtilis* YB886. Die Länge der flankierenden Sequenzen betrug etwa 1,8 kbp stromabwärts bzw. 1,2 kbp stromaufwärts der Genfusion. In *B. subtilis* besteht zwischen der Rekombinationsfrequenz und der Länge der homologen Sequenzen eine lineare Abhängigkeit, wobei homologe Sequenzen von 70 Bp Länge das Minimum darstellen (Khasanov et al., 1992). Auf Basis dieser Literaturdaten war die Länge der homologen Sequenzen für einen effizienten Rekombinations-Prozeß ausreichend.

Die Einschleusung der Integrationsvektoren in *B. subtilis* YB886 erfolgte mittels Elektroporation (3.2.2.2) und die Selektion rekombinanter Klone wurde auf Vollmedium-Platten durchgeführt, die mit 2 % (w/v) Xylose und 5 μ g/ml Chloramphenicol supplementiert waren. Für die Wahl der Selektionsbedingungen waren folgende Kriterien ausschlaggebend: (1) Da für die Konstruktion von pS2.1 und pD2b der Klonierungsvektor pSP64 verwendet wurde, dessen Replikations-*origin* pMB1 nur in *E. coli*-Zellen aktiv ist, waren die Integrationsvektoren in *B. subtilis* nicht replikativ. Nach der Elektrotransformation erhaltene chloramphenicolresistente Zellklone konnten folglich nur durch integrative Rekombination des *cam*-Gens ins Chromosom von *B. subtilis* YB886 entstanden sein. (2) Die chromosomale Integration der verwendeten Vektoren pS2.1 bzw. pD2b konnte auf drei verschiedene Arten erfolgen. So war es möglich, daß die Integration nur über eine der homologen Sequenzen am 3'- oder am 5'-Ende der modifizierten Genregion erfolgt. Durch solche unerwünschten Rekombinationsvorgänge wird die vollständige Plasmid-DNA ins Chromosom integriert und das native *rpmH-rnpA*-Operon wäre auf dem Chromosom erhalten geblieben. Folglich wäre die Xylose-Abhängigkeit der *rnpA*-Genexpression verloren gegangen. Die gewünschte chromosomale Integration hingegen sollte über ein doppeltes, homologes Rekombinationsereignis am 5'- und am 3'-Ende der jeweiligen modifizierten Genregion erfolgen. Bei diesem Vorgang wird das native *rnpA*-Gen durch das P_{xyI}::*rnpA* bzw.

$P_{xyl}::(\Delta rpmH::rnpA)$ -Fusionsgen substituiert. Dadurch wäre nur das *xyl*-Promotor regulierte *rnpA*-Gen der Genfusion chromosomal vorhanden, dessen Expression Xylose-abhängig sein sollte. (3) In *E. coli* konnte gezeigt werden, daß das RNase P-Protein *in vivo* für die katalytische Aktivität der RNase P essentiell ist (Schedl et al., 1973; Sakano et al., 1974; Tallsjö und Kirsebom, 1993). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der RNase P-Enzyme erschien es demnach wahrscheinlich, daß die *rnpA*-Genexpression auch in *B. subtilis* für das Überleben der Zellen entscheidend ist. Unter Berücksichtigung der genannten Kriterien sollten rekombinante Klone, bei denen eine Substitution des nativen *rnpA*-Gens durch einen doppelten homologen Rekombinationsvorgang erfolgte, die Eigenschaften Chloramphenicolresistenz und Xylose-Abhängigkeit aufweisen.

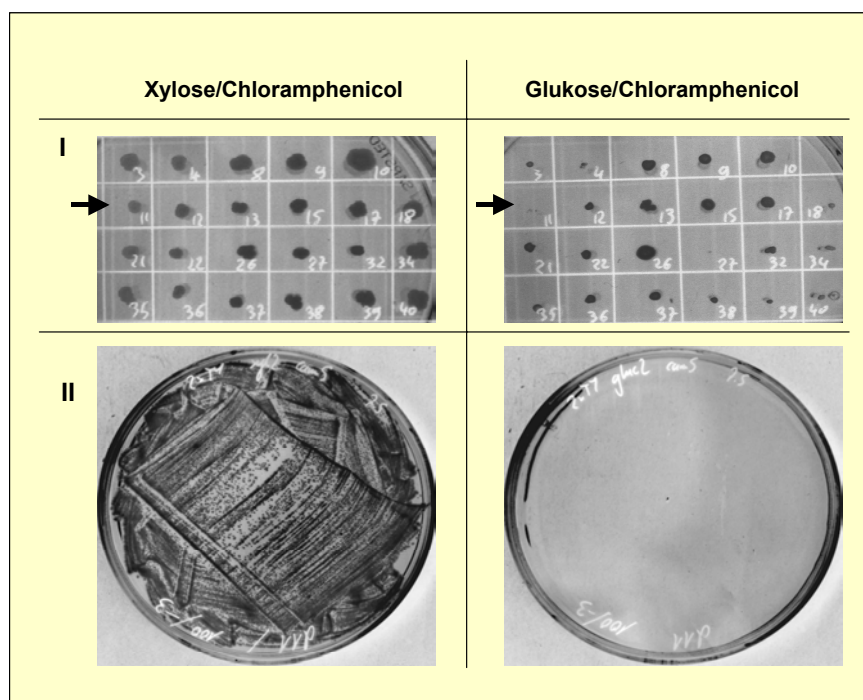


Abb. 4.6: Selektion rekombinanter *B. subtilis*-Klone. (I) Gezeigt ist das Wachstum einzelner Klone, die mit dem pD2b-Integrationsvektor (Konstrukt II) elektrotransformiert und auf chloramphenicolhaltigen 2xTY-Platten mit 2 % (w/v) Xylose bzw. 2 % (w/v) Glukose inkubiert wurden. (II) Von einer Flüssigkultur (ca $2,1 \times 10^6$ Zellen/ml) des in (I) markierten Klon 11 (Pfeil) wurden jeweils 100 μ l auf chloramphenicolhaltige Platten mit Xylose- oder Glukose-Zusatz ausgestrichen.

Im Anschluß an die Elektroporation wurden die Zellen zunächst auf Xylose-/Chloramphenicol-haltigen Vollmediumplatten ausgestrichen. Zur weiteren Selektion wurden die auf diesen Platten angewachsenen rekombinanten Klone isoliert und auf Glukose- und Chloramphenicol-haltige Platten transferiert. Nach der Transformation von *B. subtilis* YB886 mit dem pD2b-Integrationsvektor zeigten etwa 8 % der isolierten chloramphenicolresistenten Zellen kein Wachstum nach dem Transfer auf Glukose-Platten und waren demnach auf eine Aktivierung des *xyl*-Promotors durch Xylose angewiesen (Abb. 4.6). Insgesamt konnten zwölf

chloramphenicolresistente rekombinante Klone isoliert werden, die das gewünschte Wachstumsverhalten aufwiesen. Die genomische Region dieser Klone wurde weiteren molekularen Analysen unterzogen.

Nach der Transformation von *B. subtilis* mit dem pS2.1-Integrationsvektor konnten hingegen keine rekombinanten Zellklone mit Xylose-abhängigem Wachstum isoliert werden. Zur Klärung des Sachverhalts wurden zwölf rekombinante Klone, die auf Chloramphenicol/Glukose angewachsen waren, einer genomischen Analyse unterzogen.

4.1.4 PCR-Analyse der chromosomalen Regionen nach der homologen Rekombination

Zur molekularen Charakterisierung der genomischen Region wurde von den jeweiligen rekombinanten Klonen genomische DNA präpariert (3.2.4.2), die dann als Templat für PCR-Analysen (3.2.4.8) verwendet wurde. Die dafür verwendeten *Primer*-Paare waren so konzipiert, daß sie zu unterschiedlichen Sequenzabschnitten der chromosomalen *rnpA*-Region in YB886 (\equiv wt-Region) bzw. der Konstrukte I und II komplementär waren. Anhand der Länge der amplifizierten Fragmente konnte die Gen-Anordnung in den jeweiligen chromosomalen *rnpA*-Regionen bestimmt werden. Die genomische Analyse erfolgte mit den folgenden *Primer*-Paaren: *cam*-5/*cam*-3, *cam*-5/*rnpA*-3, *dnaA*-5/*jag*-3, *dnaA*-5/*spoIIIJ*-3, *rpmH*-5/*rnpA*-3, *rpmH*-5/*spoIIIJ*-3 und *xyl*-Eco-5/*spoIIIJ*-3.

In Abbildung 4.7 ist exemplarisch das Ergebnis der PCR-Analyse mit dem *Primer*-Paar *dnaA*-5 und *spoIIIJ*-3 gezeigt. Analysiert wurden hier die *B. subtilis*-Stämme YB886 (wt), sb (Konstrukt I) und d7 (Konstrukt II).

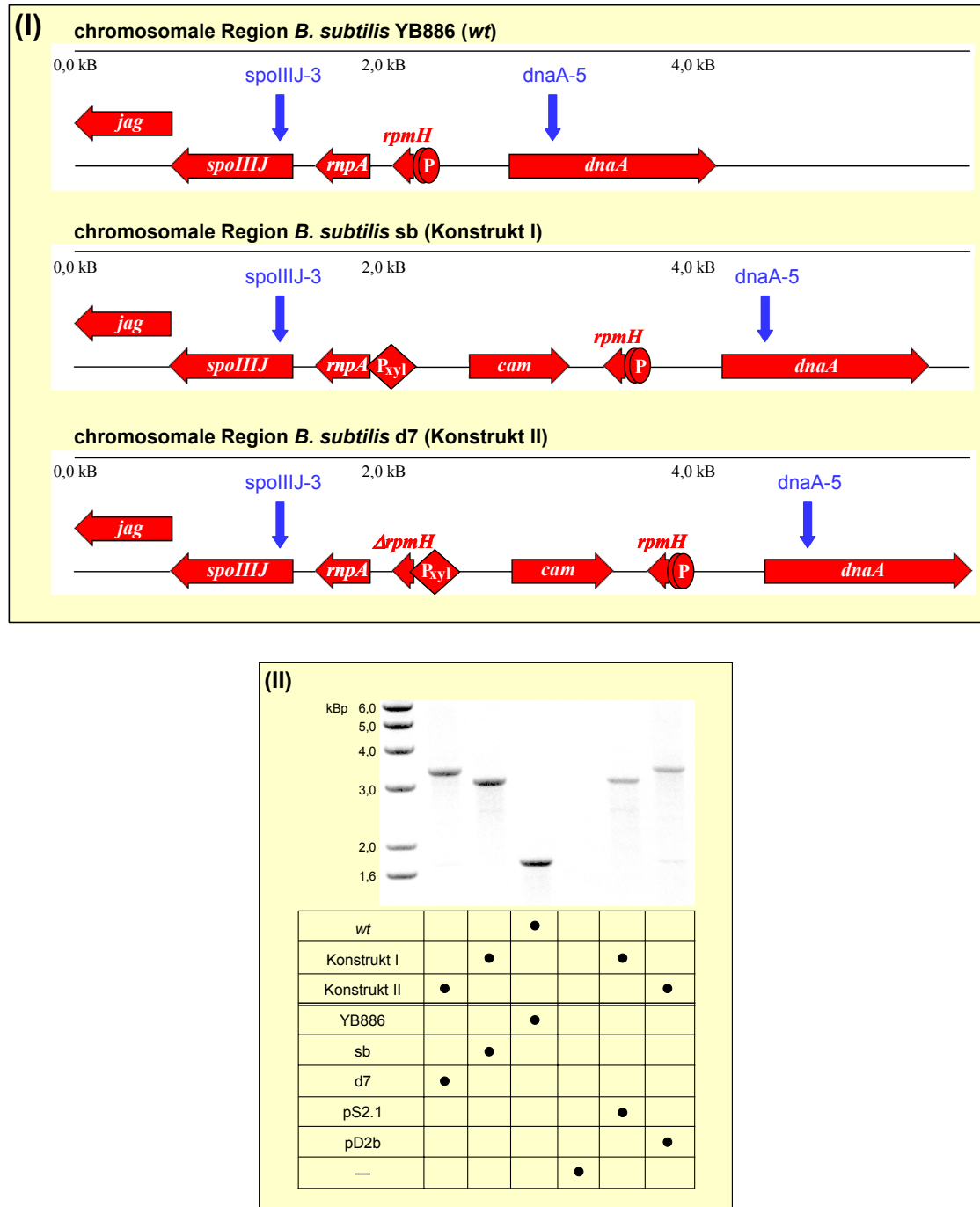


Abb. 4.7: PCR-Analyse der genomischen Region isolierter *B. subtilis*-Rekombinanten. **(I)** Schematische Darstellung der genomischen *rnpA*-Genregionen in den *B. subtilis*-Stämmen YB886 (entspricht *wt*), *sb* (chromosomale Integration von Konstrukt I in YB886) und *d7* (chromosomale Integration von Konstrukt II in YB886). Die chromosomalen Sequenzenabschnitte, die zu den Primern *dnaA*-5 und *spoIIIJ*-3 komplementär sind, sind durch blaue Pfeile gekennzeichnet. Der native Tandem-Promotor des *rpmH*-*rnpA*-Operons (P) und der Xylose-Promotor (P_{xyI}) sind gekennzeichnet **(II)** Exemplarisch ist die PCR-Amplifizierung mit dem Primer-Paar „*dnaA*-5“ und „*spoIIIJ*-3“ gezeigt (Negativbild-Darstellung). Von genomischer bzw. Plasmid-DNA wurden Fragmente PCR-amplifiziert und auf ein 0,8 % Agarose-Gel aufgetragen. Die genomische DNA wurde von den *B. subtilis*-Stämmen YB886, *sb* und *d7* präpariert. Als spezifische Größenmarker dienten Fragmente aus PCR-Ansätzen, in denen die Plasmid-DNA der Integrationsvektoren pS2.1 (Konstrukt I) und pD2b (Konstrukt II) als Templat verwendet wurde. Folgende Fragmentlängen wurden anhand der Sequenz berechnet: *wt* = 1,77 kbp, Konstrukt I = 3,15 kbp und Konstrukt II = 3,42 kbp. Als Negativ-Kontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne Templat.

Nach der Elektrotransformation von *B. subtilis* YB886 mit dem Integrationsvektor pS2.1 konnte der Stamm sb isoliert werden. Aufgrund seiner Chloramphenicolresistenz konnte von einer chromosomalen Integration des Konstrukts I ausgegangen werden. Obwohl dieser Stamm in Abwesenheit von Xylose wachsen konnte, konnte die native *mnpA*-Region von YB886 (\equiv *wt*-Region) nicht mittels PCR-Analyse detektiert werden. Demzufolge konnte ausgeschlossen werden, daß die Rekombination nur über eine der homologen Sequenzen am 3'- oder 5'-Ende des Konstrukts stattgefunden hatte, da die native *mnpA*-Region in diesem Fall noch chromosomal vorhanden gewesen sein müßte. Mit den verschiedenen *Primer*-Kombinationen wurden ausschließlich solche Fragmente der genomischen sb-DNA amplifiziert, deren Längen mit dem Konstrukt I übereinstimmten. Demnach erfolgte bei Stamm sb der gewünschte chromosomale Austausch der *mnpA*-Regionen durch ein doppeltes homologes Rekombinationsereignis. Offensichtlich war jedoch die Lebensfähigkeit des Stamms sb nicht von der Induktion des *xyl*-Promotor-regulierten *mnpA*-Gens abhängig. Diese Beobachtungen konnten für zwei weitere Isolate (Stamm sc und Stamm sd) bestätigt werden: die Ergebnisse der PCR-Analysen deuteten darauf hin, daß die *mnpA*-Region des Wildtyps in diesen Stämmen nicht vorhanden ist - beide Stämme wuchsen jedoch ebenfalls in Abwesenheit von Xylose.

Dagegen wurden auch neun chloramphenicolresistente Stämme isoliert, in deren chromosomaler DNA die native *mnpA*-Region mittels PCR-Analyse detektiert werden konnte. Demnach fand in diesen Fällen die homologe Rekombination nur über das 5'- oder 3'-Ende statt. Das Xylose-unabhängige Wachstum der Stämme sb, sc und sd mußte folglich eine andere Ursache haben. Für die anschließenden Untersuchungen zur Klärung dieser Frage wurde repräsentativ der Stamm sb verwendet.

Nach der Transformation von *B. subtilis* YB886 mit pD2b konnten hingegen rekombinante Zellklone isoliert werden, die die beiden Kriterien Chloramphenicolresistenz und Xylose-Abhängigkeit erfüllten. Das Ergebnis der PCR-Analyse von Stamm d7 steht stellvertretend für $5/_{12}$ der isolierten Rekombinanten (Stamm d3, d7, d8, d9 und d11). Bei diesen *B. subtilis*-Stämmen wurden ausschließlich Fragmente der genomischen *mnpA*-Region amplifiziert, die mit den für Konstrukt II berechneten Fragmentlängen übereinstimmten. Folglich hat in diesen Stämmen ein doppeltes homologes Rekombinationsereignis dazu geführt, daß das native *mnpA*-Gen durch die $P_{xyl}::(\Delta rpmH::mnpA)$ -Genfusion substituiert wurde und die Rekombinanten das beabsichtigte Xylose-abhängige Wachstum aufwiesen. Die Xylose-induzierte Expression des *mnpA*-Gens war in dem Konstrukt II-Kontext offensichtlich essentiell für die Zellen. Für die übrigen isolierten Zellklone wurde bei der PCR-Analyse ein DNA-Fragment amplifiziert, dessen Fragmentlänge weder der *wt*-Region noch Konstrukt I oder Konstrukt II zugeordnet werden konnte. Diese Stämme wurden nicht weiter analysiert.

Für die weitere Analyse eines *B. subtilis*-Stamms mit chromosomal integriertem Konstrukt II wurde stellvertretend der Stamm d7 verwendet.

4.1.5 Überexpression des Xylose-Repressors (XylR) im *B. subtilis*-Stamm sb

Es wäre denkbar, daß der *xyl*-Promotor aufgrund einer limitierten intrazellulären XylR-Konzentration eine Basalaktivität aufweist. Dadurch könnte das *rnpA*-Gen in Konstrukt I auch in Abwesenheit des Induktors Xylose in geringem Maße exprimiert werden und so ein Überleben der Zellen ermöglichen. Durch zusätzlich vorhandene negative Kontrollelemente hingegen würde die *xyl*-Promotor-regulierte Expression von *rnpA* nochmals reduziert werden.

Bei *B. subtilis* weist die intergenische Region zwischen dem *rpmH*-Gen und dem *rnpA*-Gen Sequenzen auf, die einen Rho-unabhängigen Transkriptionsterminator kodieren könnten (d'Aubenton-Carafa et al., 1990). Dieser Sequenzabschnitt ist nur in Konstrukt II zwischen dem *xyl*-Promotor und dem *rnpA*-Gen vorhanden. In Konstrukt I dagegen liegt das *rnpA*-Gen unter unmittelbarer Kontrolle des *xyl*-Promotors. Unterschiedliche Expressionsraten des *rnpA*-Gens in Konstrukt I und Konstrukt II könnten auch durch das Vorhandensein unterschiedlich effizienter *Shine-Dalgarno*-Sequenzen (\equiv Ribosomenbindestellen) und/oder die Identität des jeweiligen Startkodons verursacht werden. Zwar weisen nicht alle Gene obligatorisch eine *Shine-Dalgarno* Sequenz auf, ihr Vorhandensein deutet jedoch auf stark exprimierte Gene hin (Ma et al., 2002). So konnte ferner gezeigt werden, daß die Übereinstimmung mit der *Shine-Dalgarno*-Konsensus-Sequenz (5'-AAGGAGG-3'), der Abstand zwischen der *Shine-Dalgarno* Sequenz und dem Startkodon sowie die Identität des Startkodons selbst – als effektivstes Startkodon erwies sich AUG - mit der Translationseffizienz eines Gens korreliert (Ringquist et al., 1992; De Smit et al., 1994; Sakai et al., 2001). Die einzige Nukleotidfolge stromaufwärts des *rnpA*-Leserasters, die zumindest teilweise mit der *Shine-Dalgarno*-Konsensus-Sequenz übereinstimmt, überlappt mit dem GUG-Startkodon (5'-GGAGTG-3'). Die potentiellen Haarnadelstrukturen in der intergenischen Region zwischen $\Delta rpmH$ und *rnpA*, das Fehlen einer (vollständigen) *Shine-Dalgarno*-Sequenz oder das in *B. subtilis* ineffiziente GUG-Startkodon vor *rnpA* könnten die Translationsinitiations-Rate des *rnpA*-Gens in Konstrukt II stark reduzieren. In Abwesenheit von Xylose wäre demnach die durch eine Basalexpression verursachte intrazelluläre Konzentration an RNase P-Protein nicht mehr ausreichend, um den Bedarf in der Zelle zu decken. Das Fehlen der negativen Kontrollelemente in Konstrukt I in Verbindung mit einer begrenzten intrazellulären Menge an Xylose-Repressormolekülen

könnte die Ursache dafür sein, daß der Stamm sb im Vergleich zu Stamm d7 kein Xylose-abhängiges Wachstum aufweist. Angesichts der relativ geringen Menge an RNase P-RNA, die in *B. subtilis*-Zellen vorhanden ist (Reich et al., 1986; Barrera und Pan, 2004), könnte die *xyl*-Promotor-vermittelte Basalexpression des *rnpA*-Gens in Konstrukt I für ein Überleben der Zellen ausreichen. Ein experimenteller Ansatz zum Beleg dieser Hypothese bestand darin, die *B. subtilis*-Mutante sb mit einem *xylR*-Expressionsplasmid zu transformieren. Die dadurch erzielte Erhöhung der intrazellulären XylR-Konzentration sollte theoretisch zu einer effektiveren Inaktivierung des *xyl*-Promotors und folglich zu einer Reduktion der Basalexpression des *rnpA*-Gens führen.

Für die Konstruktion des *xylR*-Expressionsplasmids wurde das *xylR*-Gen aus *B. subtilis* in den *Shuttle*-Vektor pDG148 (siehe 3.2.6.5) inseriert. Bei diesem Plasmid wird die Expression des inserierten Gens über den IPTG-induzierbaren *spac*-Promotor reguliert. Das *xylR*-Gen wurde aus dem Plasmid pIW11 (Wilhelm und Hollenberg, 1984) PCR-amplifiziert. Dieses Plasmid trägt ein 5,8 kbp langes BamH I-Fragment chromosomaler DNA von *B. subtilis* W23 mit den Genen *xylR*, *xylA* und *xylB*. Zunächst wurde mit dem *Primer*-Paar *xylR*-go und *xylR*-nd ein 1,27 kbp-langes Fragment von pIW11 amplifiziert, welches das *xylR*-Gen inklusive einer 107 bp-langen Sequenz stromabwärts des Stopkodons umfaßt. Mittels *Primer*-gerichteter Mutagenese wurden mit *xylR*-go bzw. *xylR*-nd die Erkennungssequenzen Avr II (Xba I-kompatibel) bzw. Sal I generiert. Der 5'-*Primer* *xylR*-go wurde außerdem so konzipiert, daß der Sequenzabschnitt zwischen *Shine-Dalgarno*-Sequenz und GUG-Startkodon des *xylR*-Gens nach der Integration in das Expressionsplasmid - in Anlehnung an die Publikation von Yansura und Henner (1984) - 12 bp lang war. Das Avr II/Sal I-verdaute PCR-Fragment wurde daraufhin in Xba I/Sal I-linearisiertes pDG148-Plasmid inseriert. Daraus resultierte der als p2 bezeichnete *xylR*-Expressionsvektor, der durch Sequenzierung überprüft wurde. Wie in Abbildung 4.8 gezeigt konnten durch die Elektrotransformation von Zellklon sb mit Vektor p2 Transformanten (\Rightarrow sb[p2]) mit Xylose-abhängigem Zellwachstum isoliert werden. Durch analytische Plasmidpräparation (3.2.4.3) und anschließende Restriktionsanalyse (3.2.4.4) mit Pst I und Hind III konnte das p2-Plasmid in den isolierten rekombinanten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen war das Koloniewachstum der nicht-transformierten sb-Zellen unabhängig von Xylose. Durch die Transformation von Stamm sb mit dem Vektor pDG148 (\Rightarrow sb[pDG148]) wurde das Verhalten der Zellen nicht signifikant verändert.

Für die Wachstumsinhibition von Stamm sb[p2] auf Xylose-freiem Medium war allerdings keine IPTG-Induktion des *spac*-Promotor regulierten *xylR*-Gens erforderlich. Der in *B. subtilis* aktive Replikations-*origin* auf Plasmid pDG148 stammt ursprünglich aus dem *Staphylococcus aureus*-Vektor pUB110. Dieser Vektor liegt in einer Kopienzahl von 30-50 in der Zelle vor (McKenzie et al., 1986). In Veröffentlichungen von Eichenbaum et al. (1998)

und Bhavsar et al. (2001) wurden induzierbare Promotoren von grampositiven Bakterien analysiert und miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, daß auch in Abwesenheit des spezifischen Induktors bei *spac*- und *xyl*-Promotor eine geringe Basalexpression detektierbar ist. Diese war beim *xyl*-Promotor jedoch bedeutend niedriger als beim *spac*-Promotor. Zudem kann theoretisch davon ausgegangen werden, daß in den sb[p2]-Zellen zwei chromosomale *xyl*-Promotoren (der native und der durch Rekombination insertierte) und 30-50 Kopien des plasmidalen *xylR*-Gens vorhanden sind. Es kann somit der Schluß gezogen werden, daß durch die Basalaktivität des *spac*-Promotors die intrazelluläre Konzentration an XylR auch ohne IPTG-Induktion in solch einem Ausmaß erhöht war, daß eine effiziente Reprimierung des *xyl*-Promotors erfolgte.

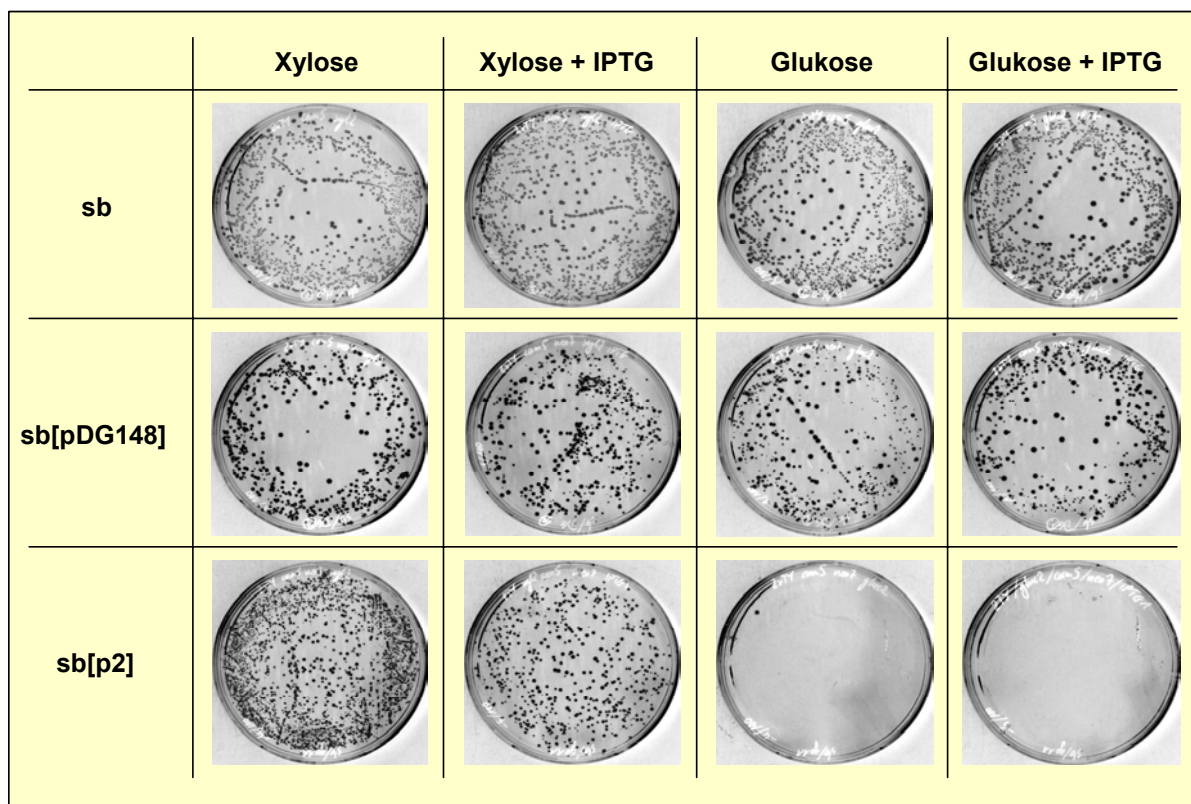


Abb. 4.8: Erhöhung der *xylR*-Kopienzahl in dem rekombinanten *B. subtilis*-Stamm sb. Die *B. subtilis*-Rekombinante mit dem ins Chromosom integrierten Konstrukt I (Stamm sb) wurde mit einem *xylR*-Expressionsplasmid (p2) transformiert und auf chloramphenicolhaltigen 2xTY-Platten mit 2% (w/v) Xylose bzw. 2% (w/v) Glukose ausplattiert. Zur Selektion von Transformanten mit dem Kontrollplasmid pDG148 bzw. *xylR*-Expressionsplasmid p2 wurde dem Medium 20 µg/ml Kanamycin zugegeben. Die Induktion des *spac*-Promotors erfolgte durch 1 mM IPTG im Medium. Pro Platte wurden 100 µl einer Zellkultur mit 10⁴ Zellen/ml ausplattiert.

4.1.6 Analyse der chromosomal integrierten $P_{xyl}::rnpA$ -Genfusionen mittels der *Southern Blot*-Methode

Die Integration der Genfusionen $P_{xyl}::rnpA$ und $P_{xyl}::(\Delta rpmH::rnpA)$ ins Chromosom von *B. subtilis* YB886 sollte zusätzlich durch *Southern Blot*-Analysen verifiziert werden. Hierzu wurde die aus den Stämmen YB886, sb, d3 und d7 isolierte chromosomale DNA mit den Restriktionsendonukleasen Acc I, BstX I und Hind III verdaut, wobei Erkennungssequenzen für Acc I ausschließlich außerhalb und für Hind III sowohl innerhalb als auch außerhalb der rekombinierten chromosomalen Region liegen (Kunst et al., 1997). Erkennungssequenzen für BstX I befinden sich innerhalb des *spoIIIJ*-Gens und stromabwärts des *dnaA*-Gens (siehe auch Abb. 4.3). Da die Sequenz des *cam*-Gens ebenfalls eine BstX I-Restriktionsschnittstelle aufweist, wird durch die chromosomale Integration der modifizierten Regionen in Stamm sb und Stamm d7 (bzw. d3) eine zusätzliche BstX I-Erkennungssequenz hinzugefügt. Nach der Auftrennung der Restriktionsansätze auf einem Agarose-Gel wurden die chromosomalen Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert (siehe 3.2.6.3) und mit dem am 5'-Ende radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid "*rnpA*-Sonde", welches komplementär zu einem 50 Nukleotide langen zentralen Sequenzabschnitt des *rnpA*-Gens ist, hybridisiert (Abb. 4.9). Nach der Restriktionsspaltung mit den Enzymen Acc I und Hind III waren die *rnpA*-Gen-tragenden DNA-Fragmente aus Stamm sb bzw. Stamm d3/d7 aufgrund des insertierten *cam*-Gens und der $P_{xyl}::rnpA$ - bzw. $P_{xyl}::(\Delta rpmH::rnpA)$ -Genfusion 1,38 bzw. 1,65 kBp länger als das *wt*-Fragment aus *B. subtilis* YB886. Durch die zusätzliche BstX I-Schnittstelle innerhalb des *cam*-Gens war das DNA-Fragment mit der *rnpA*-kodierenden Region aus der Mutante sb bzw. Mutante d3/d7 nach der BstX I-Restriktionsspaltung 4,94 bzw. 4,66 kBp kürzer als das entsprechende *wt*-Fragment von Stamm YB886.

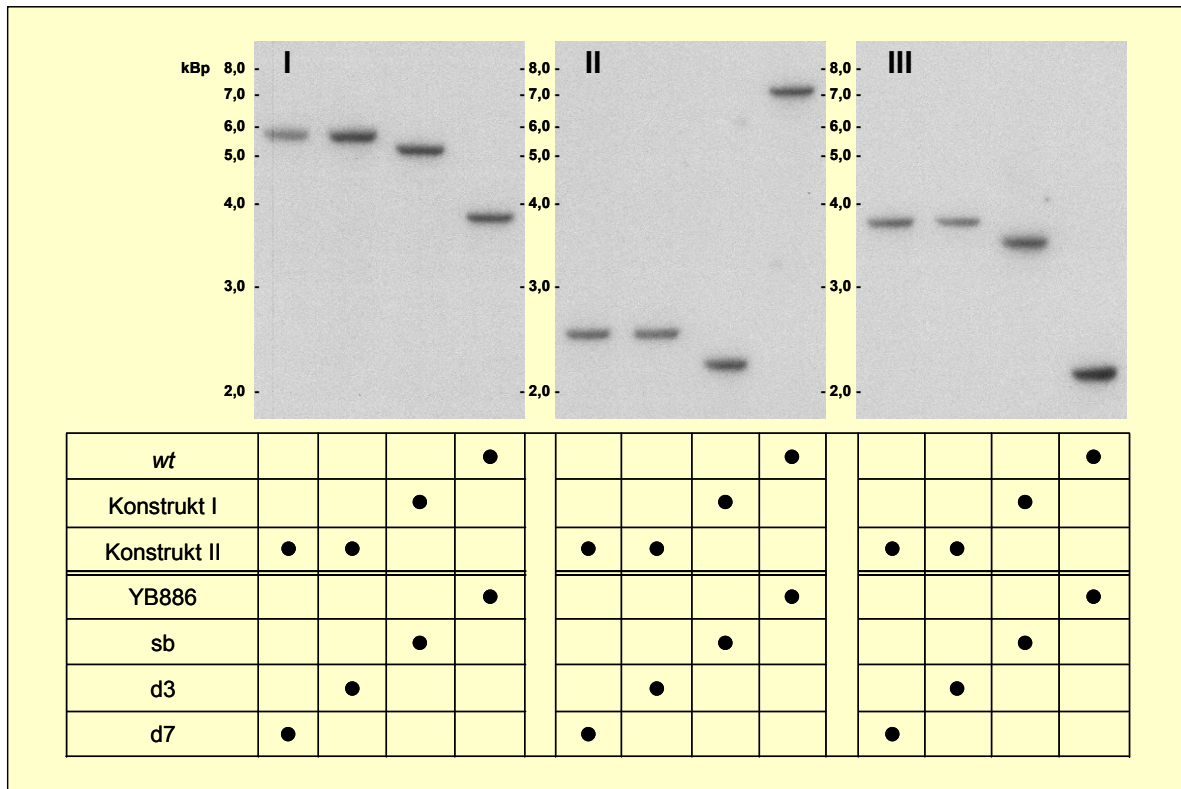


Abb. 4.9: Analyse der chromosomalen *mpA*-Region mittels der *Southern Blot*-Methode. Die aus den Stämmen YB886 (*wt*-Region), sb (chromosomale Integration Konstrukt I) und d3/d7 (chromosomale Integration Konstrukt II) präparierte chromosomale DNA wurde mit den Restriktionsenzymen Acc I (I), BstX I (II) oder Hind III (III) verdaut. Anschließend wurden 5 µg chromosomale DNA/Spur aus dem jeweiligen Restriktionsansatz auf einem 0,7 % (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Detektion der *mpA*-kodierenden Restriktionsfragmente erfolgte über die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde. Diese „*mpA*-Sonde“ war zu einem 50 Nukleotide langen, zentralen Sequenzabschnitt des *mpA*-Gens komplementär. Die Länge der detektierten Fragmente stimmte mit den anhand der Sequenz berechneten Fragmentlängen für die *wt*-Region und die nach doppelter homologer Rekombination entstandene sb- bzw. d3/d7-Region überein: (I) *wt* = 3,89 kBp, sb = 5,27 kBp und d3 / d7 = 5,54 kBp nach Acc I-Restriktionsspaltung; (II) *wt* = 7,09 kBp, sb = 2,15 kBp und d3 / d7 = 2,43 kBp nach BstX I-Restriktionsspaltung; (III) *wt* = 2,13 kBp, sb = 3,51 kBp und d3 / d7 = 3,78 kBp nach Hind III-Restriktionsspaltung.

Die Resultate der *Southern Blot*-Analyse stimmten mit denen der PCR-Analyse überein und zeigten, daß die chromosomale Integration der Konstrukte I und II in Stamm sb und d3 bzw. d7 wie beabsichtigt über ein doppeltes homologes Rekombinationsereignis erfolgt waren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß nur der *B. subtilis*-Stamm d7 eine effiziente Inhibierung der chromosomalen *mpA*-Expression in Abwesenheit von Xylose und den damit verbundenen letalen Phänotyp zeigte. Folglich war nur dieser Stamm für die geplanten Versuche bzw. Anwendungen geeignet. Der Stamm sb wurde nicht weiter verwendet.

4.1.7 Analyse der *rnpA*-Genexpression in *B. subtilis*-Stamm d7 mittels RT-PCR

Im Anschluß an die Charakterisierung der chromosomalen Regionen wurde untersucht, ob der letale Phänotyp von Stamm d7 in Abwesenheit von Xylose tatsächlich auf eine reprimierte *rnpA*-Genexpression zurückzuführen ist. Hierfür wurde die Transkription des chromosomalen *rnpA*-Gens in Stamm d7 im induzierten Zustand (in Gegenwart von Xylose) und im reprimierten Zustand (in Gegenwart von Glukose) mittels der RT-PCR-Methode (3.2.5.2) analysiert. Die RT-PCR wurde mit den *rnpA*-spezifischen *Primern* RT1-duoC5 und RT2-duoC5 durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich bedingt auch semi-quantitative Aussagen über die Transkriptionsstärke machen (Chelly et al., 1990). Zu diesem Zweck wurde angestrebt, daß die PCR-Reaktion im Anschluß an die cDNA-Synthese noch innerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase abgebrochen wird. In diesem Bereich ist die Menge an amplifiziertem Produkt proportional zur cDNA-Ausgangsmenge. Man kann davon ausgehen, daß der Anstieg bis zu einer Produktmenge von 10^{-8} M exponentiell erfolgt. Nur in dieser Phase besteht auch ein nachvollziehbarer Zusammenhang zwischen der Produktmenge und der Templatmenge. Die dahingehende Optimierung erfolgte vorwiegend über die Parameter RNA-Ausgangsmenge (Templat), Länge des amplifizierten Fragments und PCR-Zyklenzahl.

Ausgehend von der Annahme, daß das 237 Bp lange *rpsR*-Gen - welches für das ribosomale Protein S18 kodiert - keiner Xylose-/Glukose-Regulation unterliegt, sollte die Stärke der *rpsR*-Expression bei der Kultivierung der d7-Zellen in den mit Xylose oder Glukose supplementierten Medien praktisch gleich sein. Aus diesem Grund wurde die *rpsR*-mRNA in den RNA-Präparationen als interner Standard verwendet. Auf diese Weise konnten die in die Reaktionen eingesetzten RNA-Ausgangsmengen zusätzlich zur photometrischen Konzentrationsbestimmung (3.2.3.3) bewertet werden. Dies sollte gewährleisten, daß beim Vergleich der *rnpA*-Genexpression in Xylose- und Glukose-haltigem Medium identische Mengen Gesamt-RNA als Templat in den RT-PCR-Ansätze verwendet wurden.

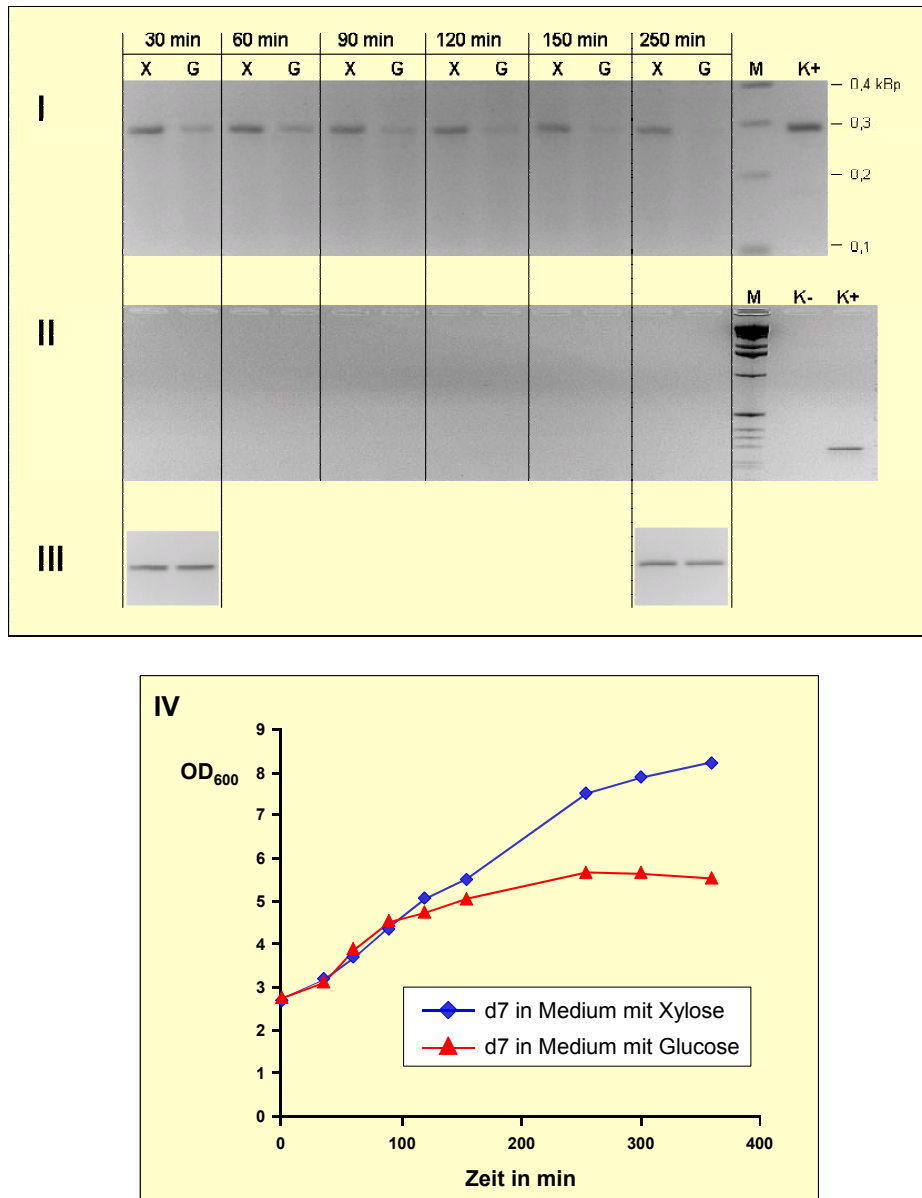


Abb. 4.10: Analyse der *mpaA*-Transkription in Stamm d7 in Abhängigkeit von Xylose. In **(I)-(III)** wurden jeweils gleiche Volumina der (RT-)PCR-Ansätze auf ein 2,5 % (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Die RNA-Präparationen für die RT-PCR-Analyse wurden von d7-Zellkulturen nach der angegebenen Wachstumszeit in 2% (w/v) Xylose-haltigem (X) oder 2% (w/v) Glukose-haltigem (G) Medium angefertigt. Die Menge der als Templat eingesetzten Gesamt-RNA wurde spektralphotometrisch bestimmt und betrug in allen RT-PCR-Ansätzen 1,5 µg. In Spur M wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen **(I)** RT-PCR mit den *mpaA*-spezifischen *Primern* RT1-duoC5 und RT2-duoC5. Als Positivkontrolle (K+) diente ein RT-PCR-Ansatz mit genomischer DNA von d7 als Templat. **(II)** Zur Kontrolle wurden die entsprechenden PCR-Reaktionen ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Auf diese Weise können DNA-Kontaminationen in den RNA-Präparationen detektiert werden. In der Negativkontrolle (K-) wurde die PCR-Reaktion ohne *Primer* durchgeführt, in der Positivkontrolle (K+) wurde genomische DNA als Templat in den PCR-Reaktionsansatz gegeben. **(III)** RT-PCR-Analyse mit *rpsR*-spezifischen *Primern* (*rpsR-R* und *rpsR-F*) als interner Standard. Diese interne Kontrolle erlaubte einen Vergleich der in die RT-PCR-Ansätze gegebenen Mengen Gesamt-RNA. **(IV)** Parallel zur RT-PCR durchgeführte Wachstumsanalyse der beiden d7-Kulturen in Medium mit 2% Xylose (blaue Kurve) oder 2% Glukose (rote Kurve). Das Zellwachstum wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt.

Mit einer in Xylose-supplementiertem Medium angewachsenen d7-Starterkultur wurde Medium mit 2% Xylose oder 2% Glukose angeimpft und unter Schütteln inkubiert. Die Zellen der Starterkultur wurden zuvor zweimal mit Xylose-freiem Medium gewaschen. Die optische Dichte der Kulturen wurde während des Versuchs aufgezeichnet und in konstanten Zeitintervallen wurden Zellsuspension-Aliquots für die RNA-Präparationen entnommen. Die präparierte zelluläre Gesamt-RNA wurde anschließend hinsichtlich der *mnpA*-Genexpression mittels RT-PCR analysiert. Das Resultat dieser Untersuchungen ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

Demzufolge ist 150 min nach dem Transfer der d7-Zellen in Xylose-freies Medium nahezu kein *mnpA*-Transkript mehr in der Gesamt-RNA detektierbar. Dies zeigt, daß die *mnpA*-Genexpression in Stamm d7 in Abwesenheit von Xylose reprimiert wird.

Entsprechend stagnierte das Wachstum der d7-Zellkultur in Xylose-freiem Medium nach 100 min, wie anhand der parallel zur RT-PCR-Analyse angefertigten Wachstumskurve zu erkennen ist. Ab diesem Zeitpunkt verläuft die Wachstumskurve dieser Kultur deutlich unterhalb der der Zellkultur in Xylose-haltigem Medium. Dabei muß auch die relativ hohe Zelldichte zu Beginn des Versuchs ($OD_{600} \approx 2,7$) berücksichtigt werden. In der annähernd stationären Wachstumsphase erfolgen weniger Zellteilungen und die Ausdünnung an intrazellulärem RNase P-Enzym ist infolgedessen verlangsamt. Die hohe OD_{600} zu Versuchsbeginn wurde gewählt, um auch nach einer längeren Wachstumsphase in Abwesenheit von Xylose noch ausreichende Mengen an Zellen ernten zu können.

4.2 Komplementationsanalysen

4.2.1 Homologe Komplementationsanalysen

Komplementationsanalysen mit plasmidkodiertem RNase P-Protein sollten beweisen, daß die Xylose-abhängige essentielle Funktion in dem *B. subtilis*-Stamm d7 durch das *mnpA*-Gen vermittelt wird. Zudem war es für die weiteren Anwendungen des d7-Zellsystems entscheidend, daß plasmidkodierte *mnpA*-Gene die Funktion des chromosomalen Gens komplementieren können. Zur Klärung dieser Frage wurde der d7-Stamm mit einem Expressionsvektor transformiert, der das *mnpA*-Gen von *B. subtilis* trägt. Wie bereits mittels RT-PCR gezeigt werden konnte, wird die Expression des chromosomalen *mnpA*-Gens in Stamm d7 in Abwesenheit von Xylose reprimiert (4.1.7). Unter diesen Bedingungen sollte

das plasmidkodierte RNase P-Protein die zellulären Funktionen übernehmen und ein Überleben der d7-Zellen garantieren.

Für *E. coli* wurde berichtet, daß die Überexpression des RNase P-Proteins für die Zellen toxisch ist (Gopalan et al., 1997). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß dies auch in *B. subtilis* der Fall ist, wurden zwei *mnpA*-Expressionsvektoren konstruiert, mit denen unterschiedliche Expressionsraten erzielt werden sollten. Dafür wurden den beiden folgenden Beobachtungen Rechnung getragen. Die unter 4.1.5 beschriebenen Versuchsergebnisse deuteten darauf hin, daß der *spac*-Promotor des pDG148-Expressionsvektors auch in Abwesenheit des Induktors IPTG eine signifikante Basalaktivität aufweist. Es mußte folglich davon ausgegangen werden, daß die Expression des durch den *spac*-Promotor regulierten Gens in den transformierten Zellen nicht vollständig inhibiert werden konnte. Ein Vergleich der Ergebnisse aus 4.1.3 und 4.1.5 mit dem ins Chromosom integrierten Konstrukt I (Stamm sb) und Konstrukt II (Stamm d7) ließen ferner die Schlußfolgerung zu, daß durch die in Konstrukt II vorhandene Genstruktur bzw. den zusätzlich vorhandenen Sequenzabschnitt ($\Delta rpmH$ und die intergenische Region) die Expressionsrate des *mnpA*-Gens reduziert wurde.

Im Fall des Expressionsvektors p3s wurde das *mnpA*-Gen aus *B. subtilis* YB886 direkt unter die Kontrolle des *spac*-Promotors gestellt. Durch IPTG-Induktion war hier eine starke Expressionsrate des *mnpA*-Gens beabsichtigt. Wie bereits diskutiert sollte auch im nicht-induzierten Zustand eine nachweisbare Basalexpression des *mnpA*-Gens vorhanden sein. Für die Konstruktion des Expressionsplasmids p3s wurde mit dem *Primer*-Paar kom-solo-5 und kom-3 ein 519 Bp langes *mnpA*-Fragment aus dem Integrationsvektor pD2b amplifiziert. Beide *Primer* trugen am 5'-Ende eine Xba I-Erkennungssequenz. Nach Behandlung mit Xba I wurde das Genfragment ungerichtet in den entsprechend linearisierten pDG148-Vektor (siehe 3.2.6.5) kloniert. Nach der Transformation von *E. coli*-Zellen (3.2.2.1) wurden 12 Klone für die weitere Analyse isoliert und die Orientierung des insertierten Fragments mittels Restriktionsanalyse (Doppelverdau mit Hind III und Stu I) bestimmt. Bei $\frac{1}{4}$ der analysierten Klone war das Insert in der richtigen Orientierung integriert.

Bei dem zweiten Expressionsvektor p3d wurde zwischen *spac*-Promotor und *mnpA*-Gen noch das durch Deletion inaktivierte *rpmH*-Gen ($\Delta rpmH$) sowie die intergenische Sequenz hinzugefügt. Mit dieser Konstruktion sollte in Abwesenheit des Induktors eine zusätzliche Reduktion der *spac*-Promotor-vermittelten Basalexpression bezweckt werden. Auch sollte die *mnpA*-Expressionsrate von p3d im induzierten Zustand, d.h. in Gegenwart von IPTG, niedriger sein als die von p3s. Mit dem *Primer*-Paar kom-duo-5 und kom-3 wurde ein 803 Bp langes $\Delta rpmH::mnpA$ -Fragment aus dem Integrationsvektor pD2b amplifiziert und mittels der Restriktionsenzyme Hind III und Xba I in den pDG148-Vektor ligiert. Nach der

Transformation von *E. coli* mit dem so erhaltenen p3d-Plasmid wurden Klone von der Selektionsplatte isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen.

Zu Kontrollzwecken wurde der Vektor p3dStop konstruiert. Hier wurden in einer zweistufigen PCR-Reaktion mittels der *Primer* p3stop5'out/p3stop3'in und p3stop5'in/p3stop3'out zwei Stopkodons in die 5'-Region des plasmidkodierten *mpA*-Gens eingefügt. Die Stopkodons wurden dabei von den zwei zueinander komplementären, intern gelegenen Mutagenese-*Primern* p3stop3'in und p3stop5'in kodiert. Durch einen C→G-Austausch wurde das 25. Kodon zu einem TGA-Stopkodon und durch einen C→T-Austausch das 30. Kodon zu einem TAG-Stopkodon mutiert. Dementsprechend konnte der Vektor p3dStop kein funktionstüchtiges RNase P-Protein exprimieren und diente bei der Komplementationsanalyse als Negativ-Kontrolle. Zur Konstruktion von p3dStop wurde das p3d-Plasmid als Templat verwendet. In der ersten PCR-Reaktion mit den *Primern* p3stop5'out/p3stop3'in bzw. p3stop5'in/p3stop3'out wurde ein 411 Bp- bzw. 151 Bp-Fragment amplifiziert. In der zweiten PCR-Reaktion wurden diese beiden Fragmente über die komplementären Sequenzen hybridisiert und mit den *Primern* p3stop5'out und p3stop3'out zu einem 532 Bp-Fragment amplifiziert. Über die Restriktionsschnittstellen Hind III und Stu I – kodiert in den *Primern* p3stop5'out und p3stop3'out – konnte das entsprechende Fragment auf p3d durch dieses ersetzt werden.

Die insertierten Sequenzen der Expressionsvektoren p3s, p3d und p3dStop wurden durch Sequenzierung überprüft.

Nach der Elektrotransformation von Stamm d7 mit dem jeweiligen *mpA*-Expressionsplasmid konnten Transformanten isoliert und auf das Vorhandensein der jeweiligen Plasmide untersucht werden. Der Nachweis der Plasmide erfolgte mittels PCR-Analyse, für welche aus den Zellen präparierte Gesamt-DNA (siehe 3.2.4.1) als Templat verwendet wurde. Mit den *Primern* pDG-F und pDG-R, welche zu Sequenzen 5' bzw. 3' der Klonierungsstelle (multiple cloning site) des Vektors pDG148 komplementär waren, wurden die insertierten Sequenzen PCR-amplifiziert und die Länge der amplifizierten Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3.1) überprüft. Plasmidhaltige Zellklone des Typs d7[p3s], d7[p3d] und d7[p3dStop] konnten auf diese Weise erfolgreich identifiziert werden.

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden die verschiedenen d7-Stämme auf antibiotikahaltigen Vollmedium-Platten ausplattiert, die entweder mit 2 % (w/v) Xylose oder 2 % (w/v) Glukose supplementiert waren. Zur Induktion des *spac*-Promotors wurde dem Medium im Bedarfsfall 1 mM IPTG zugegeben. Der Phänotyp der d7-Stämme auf dem jeweiligen festen Nährmedium nach Inkubation bei 37 °C über Nacht ist in der Abbildung 4.11 gezeigt.

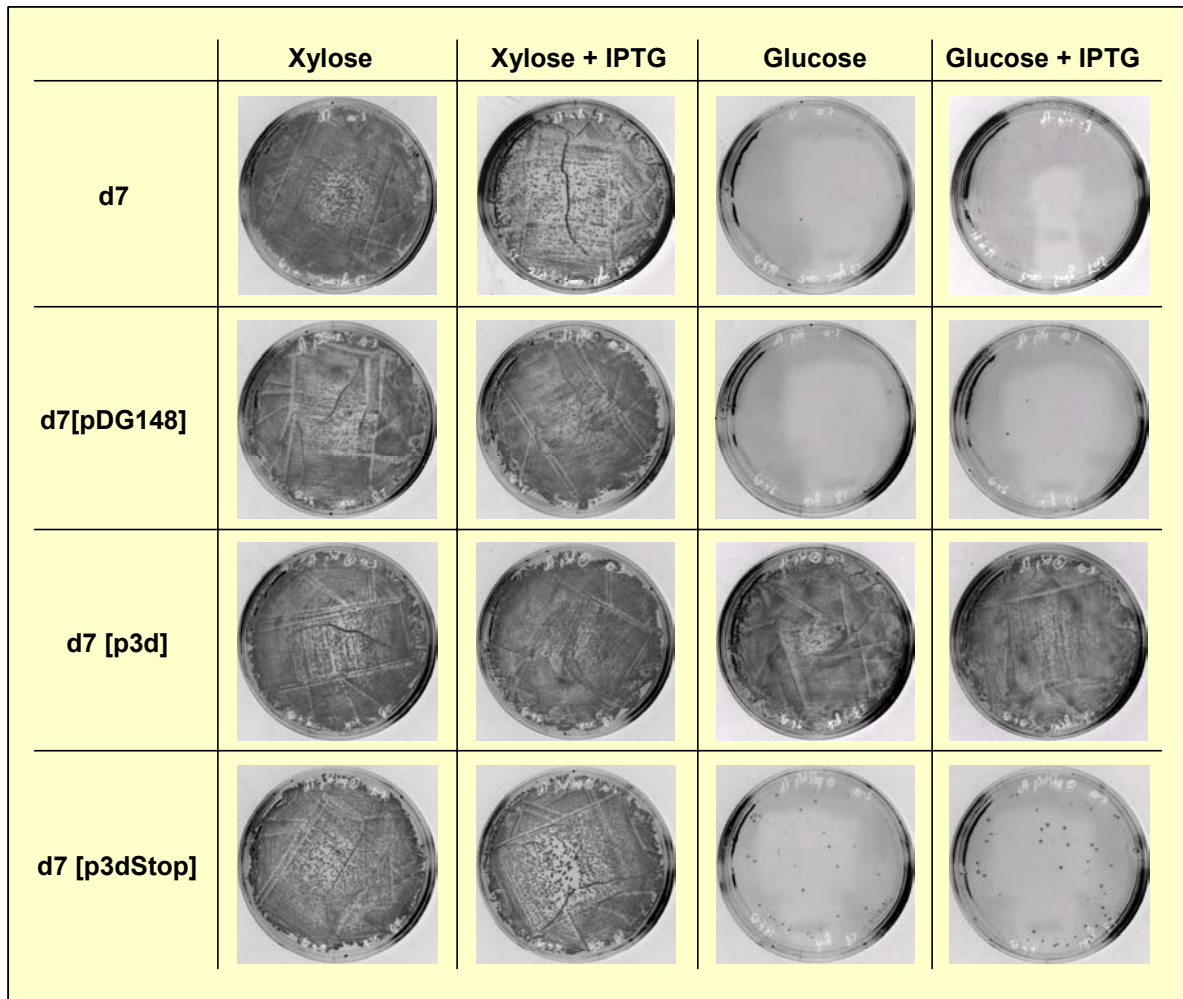


Abb 4.11: Phänotyp plasmidfreier und plasmidhaltiger *B. subtilis* d7-Zellen auf festem Nährboden. Pro Agaroseplatte wurden etwa 2×10^5 Zellen einer Übernachtskultur ausgestrichen. Das LB-Medium wurde entsprechend mit 2 % (w/v) Xylose bzw. 2 % (w/v) Glukose und 5 µg/ml Chloramphenicol angereichert. Plasmidhaltige Zellen wurden zusätzlich mit 20 µg/ml Kanamycin selektiert und die *spac*-Promotor-vermittelte Expression mit 1 mM IPTG induziert. Bei Expressionsvektor p3d steht das *rnpA*-Gen von *B. subtilis* unter der Kontrolle des *spac*-Promotors. Der Vektor pDG148 (ohne Insert) und Vektor p3dStop, welcher ein durch zwei Stopkodons inaktiviertes *rnpA*-Gen kodiert, dienten als Negativ-Kontrollen.

In Abwesenheit von Xylose bildeten nur die mit dem *rnpA*-Expressionsvektor transformierten d7[p3d]-Zellen Kolonien. Obwohl zwischen d7[p3s] und d7[p3d] kein Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die weiteren Komplementationsstudien mit dem Expressionsvektor p3d fortgeführt, bei dem entsprechend der vorherigen Resultate eine schwächere Expression zu erwarten war (siehe auch 4.1.5). Dadurch sollten unvorhersehbare Auswirkungen einer *rnpA*-Überexpression – auch wenn diese für die *B. subtilis*-Zellen nicht toxisch zu sein scheint – ausgeschlossen werden. Bei Stamm d7, d7[pDG148] und d7[p3dStop] hingegen war eine Induktion der chromosomalen *rnpA*-Expression durch Xylose für die Koloniebildung und somit das Überleben der Zellen essentiell. Daß der Xylose-abhängige Phänotyp von d7

durch die *rnpA*-Expression vermittelt wird, konnte mittels Vektor p3dStop demonstriert werden. Die wenigen auf den Glukose-haltigen Platten erkennbaren Kolonien stellen sehr wahrscheinlich Revertanten dar, bei denen die Stopkodons wieder durch Mutation eliminiert wurden. Darüber hinaus konnten die Beobachtungen aus der Studie zur Überexpression des Xylose-Repressors in Stamm sb (4.1.5) insofern bestätigt werden, als daß das unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *spac*-Promotors stehende Gen auch im nicht-induzierten Zustand transkribiert wurde. Dies zeigte die Ausplattierung von Stamm d7[p3d] auf Glukose-haltigem Medium ohne IPTG-Zusatz. Das plasmidkodierte *rnpA*-Gen lag in zahlreichen Kopien (30-50) in der Zelle vor und die Basalexpression der nicht-induzierten *spac*-Promotoren gewährleistete offensichtlich eine ausreichende Synthese des P-Proteins. Demzufolge wurden alle weiteren Komplementationsstudien standardmäßig ohne IPTG-Induktion durchgeführt.

4.2.2 Heterologe Komplementationsstudien

Die bakteriellen RNase P-Proteine weisen nur eine geringe Sequenzähnlichkeit untereinander auf. Trotzdem sind die bakteriellen RNase P-Proteine funktionell äquivalent und besitzen vermutlich alle eine vergleichbare dreidimensionale Struktur. So wurden die Kristallstrukturen der RNase P-Proteine aus *Bacillus subtilis* (Stams et al., 1998) und *Thermotoga maritima* (Kazantsev et al., 2003) sowie die NMR-Struktur des entsprechenden Proteins aus *Staphylococcus aureus* (Spitzfaden et al., 2000) bestimmt. Die grampositiven Bakterien *B. subtilis* und *S. aureus* - deren RNase P-Proteine eine Sequenzidentität von ca 48 % aufweisen - können beide der taxonomischen Klasse *Bacilli* (Abteilung: *Firmicutes*) zugeordnet werden. Beide sind im phylogenetischen Stammbaum jedoch weit von dem gramnegativen, hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* (Abteilung: *Thermotoga*) entfernt. Aufgrund von Variationen in der Sekundärstruktur können die bakteriellen RNase P-RNAs in zwei Kategorien eingeteilt werden. Die am weitesten verbreitete und ursprünglichere Typ A-Struktur findet man in verschiedenen Gruppen gramnegativer und grampositiver (hoher G+C-Gehalt) Bakterien. Den Struktur-Typ B findet man hingegen in grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt. Demnach kann die RNase P-RNA von *T. maritima* dem A-Typ und die von *B. subtilis* bzw. *S. aureus* dem B-Typ zugeordnet werden. Trotz allem stimmen die ermittelten Tertiärstrukturen der drei RNase P-Proteine bemerkenswert gut miteinander überein. Der hohe Grad an struktureller Konservierung in einem phylogenetisch breiten Spektrum - trotz niedriger Sequenzidentität - spricht für einen starken evolutionären Druck, die spezifische dreidimensionale Struktur des bakteriellen RNase P-Proteins zu erhalten. Zudem konnte mehrfach gezeigt werden, daß *in vitro* aus heterologen RNA- und

Proteinuntereinheiten der RNase P funktionelle Holoenzyme rekonstituiert werden können. So können die RNA-Untereinheiten von *Salmonella typhimurium*, *Thermus aquaticus* und *T. maritima* mit der Proteinkomponente von *E. coli* ein funktionelles Holoenzym bilden (Baer und Altman, 1985; Brown et al., 1993). Ebenso können durch heterologe Rekonstitution funktionell aktive Hybridenzyme aus der *in vitro* transkribierten RNA-Untereinheit von *B. subtilis* bzw. *E. coli* und der Proteinkomponente des jeweils anderen Organismus erhalten werden (Guerrier-Takada et al., 1983; Kirsebom und Vioque, 1995-96).

In Abbildung 4.12 ist ein mit ClustalW erstelltes Sequenz-Alignment bakterieller RNase P-Proteine gezeigt. Die aufgeführten Sequenzen stammen von Stellvertretern der Abteilungen *Actinobacteria*, *Chlamydiales*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetales*, *Thermotogales* und *Thermus/Deinococcus*. Vergleicht man z.B. die Sequenzen der Proteine von *B. subtilis* und *E. coli*, so beträgt die Sequenzidentität nur 25 %. Die stark konservierten Positionen sind dabei hauptsächlich im mittleren Drittel der Proteinsequenz lokalisiert. Allerdings gibt es mehrere Positionen, an denen die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aminosäureseitenketten in einer Vielzahl der Sequenzen ähnlich sind. Demgegenüber variieren bei einigen Bakterienspezies die Sequenzabschnitte zwischen den konservierten Sekundärstrukturelementen bezüglich Länge und Sequenz erheblich. Die Positionen der Sekundärstrukturelemente, die in Abbildung 4.12 unter den Sequenzen aufgezeigt sind, wurden aus der ermittelten Tertiärstruktur des RNase P-Proteins von *B. subtilis* (Stams et al., 1998) abgeleitet. In Komplementationsstudien in *E. coli* wurde zudem von Gopalan und Mitarbeitern gefunden, daß die Mutation einzelner stark konservierter Positionen die Funktion des RNase P-Proteins *in vivo* nicht besonders beeinträchtigt (Gopalan et al., 1997; Jovanovic et al., 2002). Werden hingegen zwei stark konservierte Positionen mutiert, so wird die Funktion stark beeinträchtigt bzw. das Protein ist gänzlich funktionsuntüchtig. Die Ursache könnte in einer funktionellen Redundanz der strikt konservierten Seitenketten liegen oder auf negativen Kooperativitätseffekten beruhen, die durch eine gleichzeitige Veränderung von zwei konservierten Positionen hervorgerufen werden. Eine umfassende *in vivo*-Funktionsanalyse von Proteinvarianten könnte genauere Informationen darüber liefern, welche Regionen bzw. Aminosäuren in Bezug auf welchen Funktionsaspekt (Proteinfaltung und -stabilität, Bindung der RNase P RNA oder Substratbindung) miteinander kooperieren. Auch könnte aus solchen Vergleichen abgeleitet werden, welche Sequenzbereiche für ein *in vivo* funktionelles RNase P-Protein mindestens erforderlich sind.

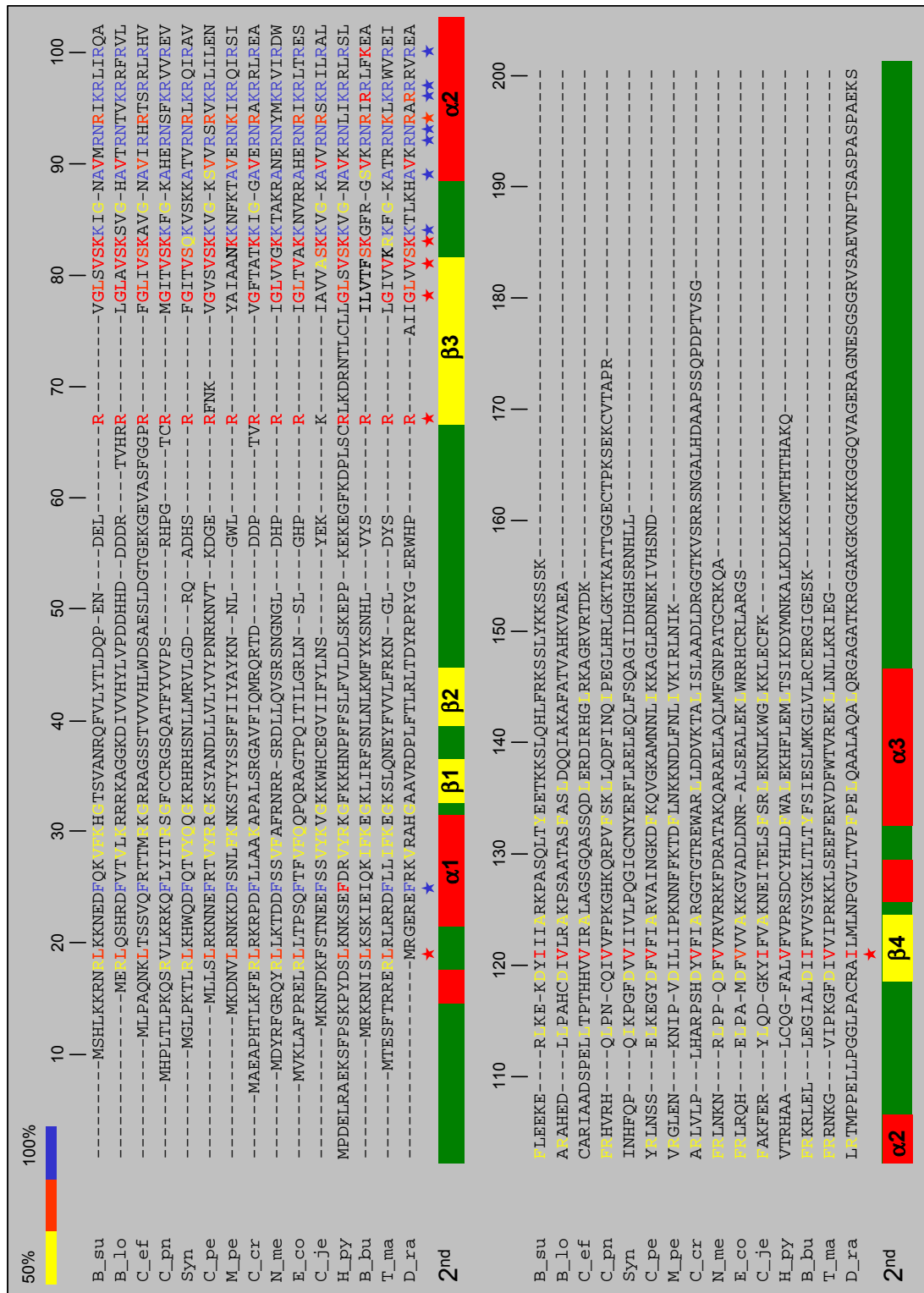


Abb. 4.12: Mit ClustalW erstelltes Alignment von 15 Sequenzen bakterieller RNase P-Proteine. B_su = *Bacillus subtilis*, B_lo = *Bifidobacterium longum* NCC2705, C_ef = *Corynebacterium efficiens*, C_pn = *Chlamydomonas reinhardtii* J138, Syn = *Synechocystis* PCC6803, C_pe = *Clostridium perfringens* str.13, M_pe = *Mycoplasma penetrans*, C_cr = *Caulobacter crescentus* CB15, N_me = *Neisseria meningitidis* Z2491, E_co = *Escherichia coli*, C_je = *Campylobacter jejuni*, H_py = *Helicobacter pylori*, B_bu = *Borrelia burgdorferi*, T_ma = *Thermotoga maritima*, D_ra = *Deinococcus radiodurans*. 2nd = die anhand der Tertiärstruktur des P-Proteins von *B. subtilis* ermittelten Sekundärstrukturelemente. Der Grad der Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit (in Prozent) ist durch den Farbbalken links oben definiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun getestet werden, ob die entwickelte Bakterien-Mutante d7 prinzipiell für heterologe Komplementationsstudien verwendet werden kann. Zur Durchführung solcher *in vivo*-Funktionsanalysen mußte der Stamm d7 mit Expressionsvektoren elektrotransformiert werden, die das *rnpA*-Gen ausgewählter Bakterienspezies tragen. Durch den Transfer der transformierten d7-Zellen in bzw. auf Xylose-freies Medium konnte die Expression des chromosomalen *rnpA*-Gens anhand der in 4.1.7 gewonnenen Ergebnisse reprimiert werden, so daß das plasmidkodierte Protein sämtliche zellulären Funktionen des RNase P-Proteins übernehmen mußte. Aus *in vitro*-Studien ist bekannt, daß die RNase P-Komponenten aus dem gramnegativen Bakterium *E. coli* z.B. mit den entsprechenden Untereinheiten aus dem grampositiven Bakterium *B. subtilis* funktionelle Holoenzyme bilden können (Guerrier-Takada et al., 1983). Das Gleiche gilt für die Protein- und RNA-Untereinheiten aus *E. coli* und dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (Baum et al., 1996). In Anlehnung an diese Befunde wurde zunächst überprüft, ob das RNase P-Protein von *E. coli* bzw. *Synechocystis* das native P-Protein in *B. subtilis* *in vivo* komplementieren kann. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, daß das RNase P-Protein neben seiner Rolle bei der tRNA-Prozessierung im RNase P-Komplex andere Funktionen in der Zelle besitzt. Diese zusätzlichen Funktionen könnten sich in den Bakterien *B. subtilis*, *E. coli* und *Synechocystis* voneinander unterscheiden.

Zur Konstruktion des Expressionsvektors p4coli wurde das *rnpA*-Gen von *E. coli* mit den Primern pQE-C5-5' und pQE-C5-3' von einem *E. coli-rnpA*-Gen tragenden pQE30-Plasmid (Rivera-Leon et al., 1995) PCR-amplifiziert (3.2.4.8) und über die Restriktionsschnittstellen Xba I und Sal I in den Vektor pDG148 inseriert. Der 5'-Primer wurde so konzipiert, daß zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und AUG-Startkodon des *E. coli-rnpA*-Gens 14 Nukleotide liegen. Nach der Transformation der Ligationsprodukte in *E. coli* (3.2.2.1) konnten Klone mit dem gewünschten Plasmid isoliert werden.

Zur Konstruktion des Expressionsplasmids p5syn wurde das *rnpA*-Gen von *Synechocystis* sp. PCC6803 mit dem Primer-Paar 5-pSynC5 und 3-pSynC5 von einem *Synechocystis-rnpA*-Gen tragenden pQE30-Plasmid – welches von A. Schön (Institut für Biochemie; Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt wurde - PCR-amplifiziert. Nach Inkubation mit den Enzymen Sal I und Sph I (3.2.4.4) wurde das amplifizierte 381 Bp lange Fragment in entsprechend geschnittenen pDG148-Vektor ligiert. In dem so konstruierten Expressionsvektor p5syn lagen 15 Nukleotide zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz und dem AUG-Startkodon des *Synechocystis-rnpA*-Gens. Die Sequenzen der *rnpA*-Gene auf den beiden Expressionsplasmiden p4coli und p5syn wurden durch Sequenzierung überprüft.

Nach Elektrotransformation konnten d7-Transformanten mit dem jeweiligen Expressionsplasmid p4coli und p5syn von den Selektionsplatten isoliert werden. Der

Nachweis der Plasmide in den transformierten d7-Zellen (d7[p4*coli*] und d7[p5*syn*]) erfolgte mittels PCR-Analyse bzw. Restriktionsanalyse nach analytischer Plasmidpräparation (3.2.4.3).

4.2.2.1 Wachstumsanalyse nach der Transformation heterologer *rnpA*-Expressionsvektoren in Stamm d7

In Abbildung 4.13 ist der Phänotyp der d7-Transformanten d7[p4*coli*] und d7[p5*syn*] nach Ausplattierung auf festem Nährmedium gezeigt. Auf Medium ohne Xylose-Zusatz, d.h. bei reprimiertem chromosomalem *rnpA*-Gen, zeigten die mit dem Kontrollplasmid transformierten d7[pDG148]-Zellen einen letalen Phänotyp. Demgegenüber wiesen die mit dem heterologen *rnpA*-Expressionsplasmid p4*coli* bzw. p5*syn* transformierten d7-Zellen auch in Abwesenheit des Induktors Xylose Koloniebildung auf. Die plasmidkodierte RNase P-Proteine von *E. coli* (d7[p4*coli*]) und *Synechocystis* (d7[p5*syn*]) können demnach das chromosomal kodierte, native Protein von *B. subtilis* funktionell ersetzen.

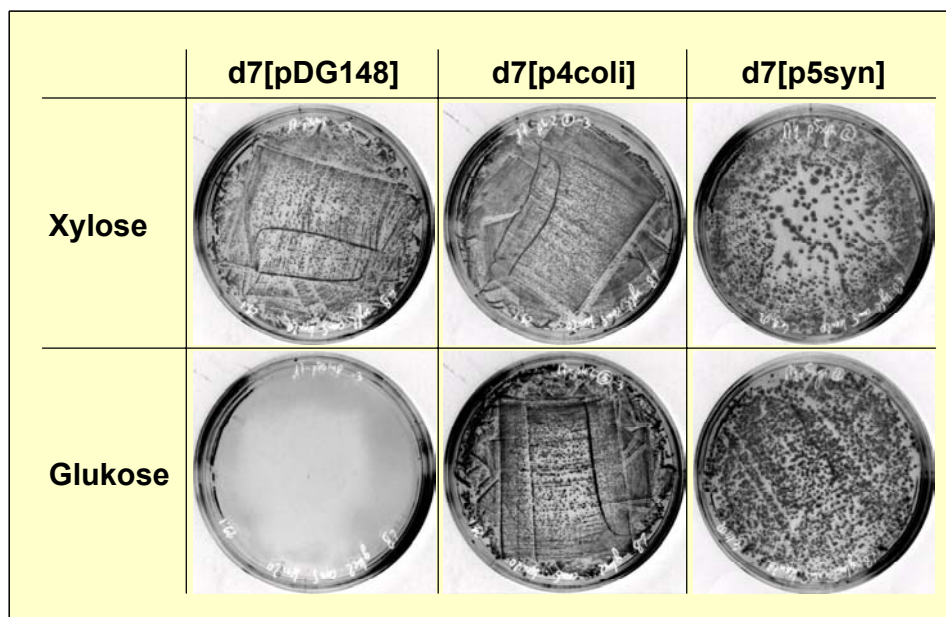


Abb. 4.13: Heterologe Komplementation mit *rnpA*-Genen aus *E. coli* und *Synechocystis*. Gezeigt ist der Phänotyp der transformierten *B. subtilis* Zellen d7[pDG148], d7[p4*coli*] und d7[p5*syn*] auf festem Nährmedium. Pro Agaroseplatte wurden ca 5×10^4 Zellen einer Übernachtskultur ausgestrichen. Das LB-Medium war mit 2 % (w/v) Xylose bzw. 2 % (w/v) Glukose, 5 µg/ml Chloramphenicol und 20 µg/ml Kanamycin supplementiert. Vektor pDG148 (ohne Insert) diente als Kontrolle, die Expressionsvektoren p4*coli* bzw. p5*syn* kodieren für das RNase P-Protein von *E. coli* bzw. *Synechocystis* sp. PCC6803.

Nimmt man die Basensequenz der 16S-rRNA als phylogenetischen Marker, so stehen die Cyanobakterien in engerer Verwandtschaft zu den grampositiven Bakterien als die Purpurbakterien. Die Sequenzidentität der RNase P-Proteine von *B. subtilis* und *Synechocystis* sp. PCC6803 bzw. von *B. subtilis* und *E. coli* liegt bei etwa 21-25 % (Abb. 4.14). In Abbildung 4.14 läßt sich gut erkennen, daß die Sequenzidentität zwischen dem RNase P-Protein aus *B. subtilis* und *Synechocystis* im N-terminalen Bereich stärker als im C-terminalen Bereich ist. Läßt man die in allen drei Sequenzen identischen Aminosäuren unberücksichtigt, so findet man im N-terminalen Bereich 8 und im C-terminalen Bereich des Proteins nur 4 identische Positionen. Im Gegensatz dazu ist bei einem Sequenzvergleich der Proteine aus *B. subtilis* und *E. coli* die Identität im C-terminalen Bereich größer als im N-terminalen Bereich. Während im N-terminalen Abschnitt nur 2 Positionen identisch sind, so befinden sich im C-terminalen Abschnitt hingegen an 10 Positionen identische Aminosäuren in den beiden Sequenzen. Die Ergebnisse aus Rekonstitutions- und Komplementationsuntersuchungen mit terminal deletierten RNase P-Proteinen aus *E. coli* deuten darauf hin, daß neben dem RNR-Motiv auch der C-terminale Bereich der Proteinuntereinheit eine entscheidende Rolle bei der Bindung an die RNA-Untereinheit spielt (Kim et al., 2000). Der N-terminale Bereich hingegen ist offensichtlich nicht an dieser Interaktion beteiligt und besitzt primär eine andere Funktion im katalytisch aktiven RNase P-Holoenzym (Kim et al., 2000). Allerdings sind die *in vitro*- und *in vivo*-Daten aus diesen Analysen teilweise widersprüchlich, so daß zusätzliche Komplementationsstudien in der *B. subtilis*-Mutante d7 dazu beitragen könnten, die Funktion der N- bzw. C-terminalen Region bakterieller RNase P-Proteine aufzuklären.

Eine Anhäufung identischer Positionen befindet sich im Bereich des Sekundärstrukturelements $\alpha 2$. Hier befindet sich das sogenannte RNR (Arg-Asn-Arg)-Motiv, welches vermutlich eine Rolle bei der Bindung der katalytischen RNA-Untereinheit spielt und als Bestandteil des aktiven Zentrums bei bakteriellen RNase P-Holoenzymen diskutiert wird. Dieser Bereich ist in allen drei Proteinen stark konserviert. Auch ist auffallend, daß in allen drei Proteinen eine Anhäufung von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten in Sekundärstrukturelement $\beta 4$ vorhanden ist.

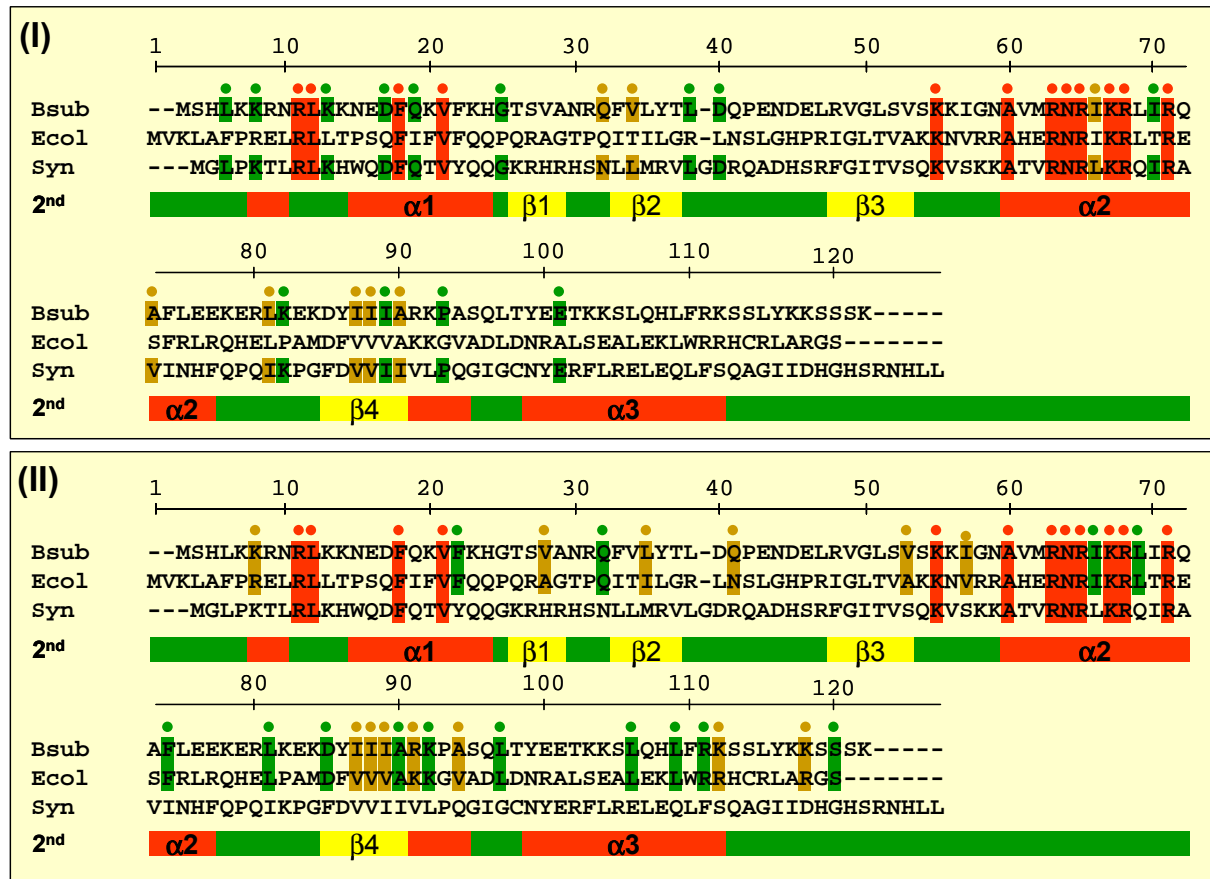


Abb. 4.14: ClustalW-Alignment (nach Corpet 1988) der RNase P-Proteinsequenzen von *B. subtilis*, *E. coli* und *Synechocystis* sp. PCC6803. Die RNase P-Proteinsequenz von *B. subtilis* ist in (I) mit der von *Synechocystis* und in (II) mit der von *E. coli* verglichen. In allen drei Sequenzen identische Aminosäuren sind rot markiert, die in den jeweils miteinander verglichenen Sequenzen identischen bzw. ähnlichen Aminosäuren sind grün bzw. hellbraun markiert. Ähnlichkeitsregeln: D = E; R = K; N = Q; S = T und A = V = L = I. Die eingefügten Sekundärstrukturelemente (2nd) basieren auf der ermittelten Tertiärstruktur der RNase P-Proteinuntereinheit von *B. subtilis* (Stams et al. 1998).

Ferner wurde das Wachstumsverhalten der verschiedenen *B. subtilis*-Stämme in Flüssigmedium analysiert. Hierzu wurden die Zellen einer Übernachtskultur pelletiert, zweifach gewaschen und dann in einem definierten Volumen 2xTY-Medium resuspendiert. Mit jeweils der Hälfte der Zellsuspension wurden dann 100 ml-Kulturen mit Xylose- oder Glukose-Zusatz angeimpft. Zur Analyse des Wachstumsverhaltens wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm in konstanten Zeitintervallen photometrisch bestimmt (siehe Abb. 4.15). Zu Beginn der Analyse betrug die OD₆₀₀ in allen Kulturen etwa 0,1-0,2. Getestet wurden die *B. subtilis*-Stämme YB886, d7, d7[pDG148], d7[p3d], d7[p4*coli*] und d7[p5*syn*].

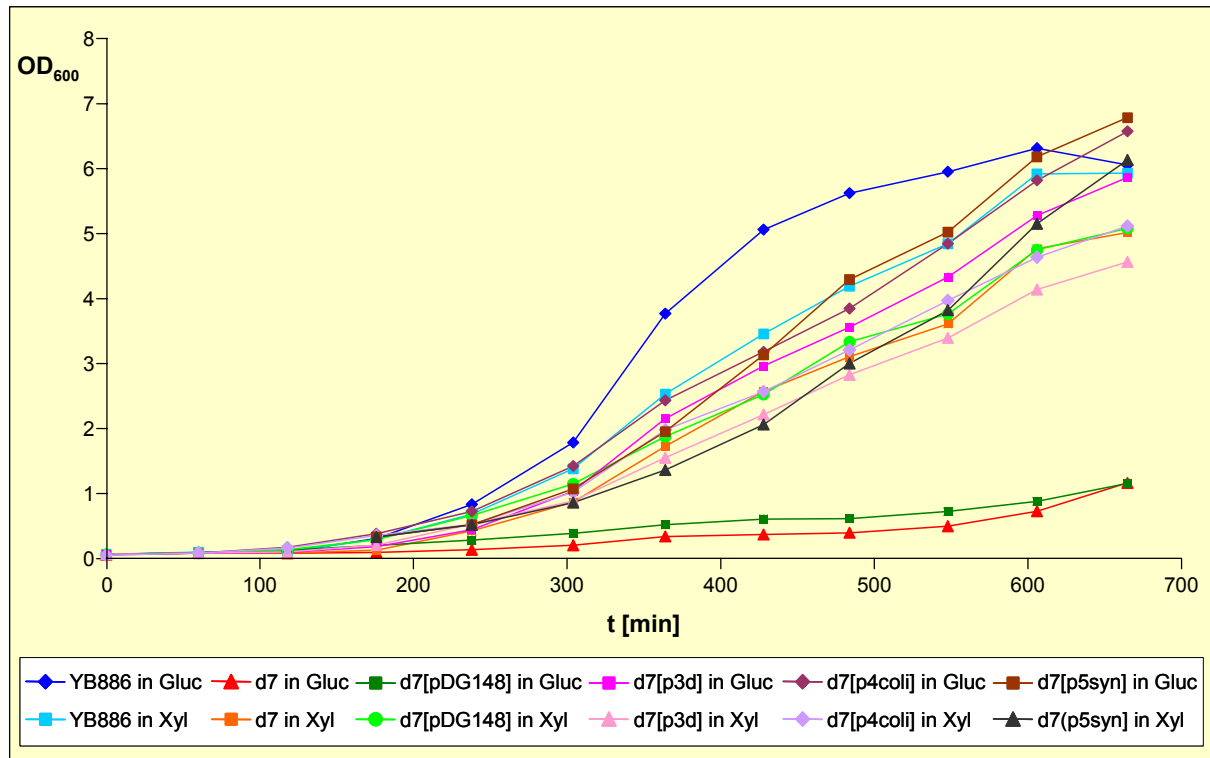


Abb. 4.15: Wachstumsanalyse der verschiedenen *B. subtilis*-Stämme. Die Stämme YB886, d7, d7[pDG148], d7[p3d], d7[p4coli] und d7[p5syn] wurden in 2xTY-Medium mit 2% (w/v) Xylose (Xyl) oder 2% (w/v) Glukose (Gluc) kultiviert. In konstanten Zeitintervallen wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm photometrisch gemessen, um das Wachstum der Zellen zu verfolgen. Zu Beginn der Analyse betrug die OD₆₀₀ in allen Kulturen etwa 0,1-0,2.

Eine Wachstumsabhängigkeit von Xylose war erneut nur bei den Stämmen d7 und d7[pDG148] erkennbar. Mit dem plasmidkodierten RNase P-Protein von *B. subtilis* (Expressionsvektor p3d) bzw. *E. coli* (Expressionsvektor p4coli) und *Synechocystis* (Expressionsvektor p5syn) konnte eine homologe bzw. heterologe Komplementation erzielt werden. Das Wachstumsverhalten dieser Stämme war in Abwesenheit von Xylose vergleichbar mit dem von d7 bzw. d7[pDG148] in Xylose-haltigem Medium.

In einer Veröffentlichung von Fang et al. (2001) wurde auf der Grundlage von *in vitro*-Untersuchungen der Schluß gezogen, daß das RNase P-Holoenzym aus *B. subtilis* Dimere bildet. Die Dimerisierung wird durch die Proteinuntereinheit vermittelt und ist von mehreren Faktoren abhängig (Fang et al., 2001; Barrera et al., 2002). In Abwesenheit von Substrat wird das Konzentrationsverhältnis Dimer:Monomer durch die Konzentration an monovalenten Ionen sowie RNase P-Holoenzym beeinflusst. In Gegenwart von Substrat liegt das RNase P-Enzym ausschließlich in der monomeren Form vor, wenn es sich bei dem Substrat um eine einzelne tRNA handelt. Besteht das Substrat aus zwei hintereinanderliegenden tRNAs, so liegt der Enzym-Substrat-Komplex in Abhängigkeit der monovalenten Ionen-Konzentration entweder in der monomeren oder dimeren Form vor. Höchstwahrscheinlich ist die zentrale Tasche des P-Proteins (siehe auch 1.3.4), die auch die 5' Flanke des prä-tRNA-Substrats

bindet, an der Dimerisierung beteiligt (Fang et al., 2001). Katalytische Aktivität und Dimerisierung würden sich diesem Modell entsprechend gegenseitig ausschliessen. Gestützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen zur Interaktion der RNase P mit der ribosomalen 30S Untereinheit in *B. subtilis* (Barrera und Pan, 2004). Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen deuten darauf hin, daß RNase P die ribosomale 30S Untereinheit nur in der dimeren Form bindet. Dadurch wird *in vitro* die Spaltungseffizienz von artifiziellen, Nicht-tRNA-Substraten reduziert. Ob die Dimerisierung von physiologischer Bedeutung ist, konnte bislang nicht geklärt werden. Ebenfalls unklar ist, ob die Dimerisierung auch bei RNase P-Enzymen anderer Bakterienspezies erfolgt. Unveröffentlichte Resultate aus der Arbeitsgruppe von Tao Pan deuten offensichtlich darauf hin, daß das RNase P-Holoenzym aus *E. coli* eine geringere Tendenz zur Dimerisierung besitzt als das Holoenzym aus *B. subtilis*. Eine von den Autoren vorgeschlagene Hypothese ist, daß sich die tRNA-Prozessierung in den beiden Bakterienspezies *E. coli* und *B. subtilis* voneinander unterscheidet. Unterschiede in der genomischen Organisation der tRNA-Gene bzw. der Enzymausstattung könnten die Ursache hierfür sein: Erstens ist im Vergleich zu *E. coli* in *B. subtilis* die 2,5-fache Anzahl aller tRNAs in Operons aus mehr als vier tRNAs organisiert. Zweitens enthalten die tRNA-Operons aus *B. subtilis* bis zu 21 hintereinander liegende tRNAs, die aus *E. coli* hingegen maximal sieben. Drittens spaltet in *E. coli* die Endonuklease RNase E – von der in *B. subtilis* kein homologes Enzym gefunden wurde – polycistronische tRNA-Transkripte in kleinere Fragmente, die aus nur einer oder zwei tRNAs bestehen. Anhand der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten heterologen Komplementationsstudien kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß - falls die Dimerisierung von RNase P in *B. subtilis* physiologisch essentiell ist – diese von den RNase P-Proteinen aus *E. coli* und *Synechocystis* vermittelt werden kann. Andererseits ist es ebenfalls denkbar, daß die heterologen Proteine die Bildung von RNase P-Dimeren nicht vermitteln können und folglich die Dimerisierung in *B. subtilis* – zumindest unter Laborbedingungen - nicht essentiell ist. Demzufolge wäre auch die Interaktion zwischen dem RNase P-Enzym und der ribosomalen 30S-Untereinheit für das Überleben der *B. subtilis*-Zellen nicht erforderlich.

4.2.2.2 Analyse der *rnpA*-Transkription in den transformierten d7-Stämmen mittels RT-PCR

Im Anschluß an die phänotypische Charakterisierung wurde der mit heterologen *rnpA*-Expressionsvektoren transformierte d7-Stamm molekularbiologisch untersucht, um sicherzustellen, daß in Abwesenheit des Induktors Xylose nur die plasmidkodierte *rnpA*-Gene transkribiert werden. Lediglich in diesem Fall können Aussagen darüber gemacht werden, ob ein heterologes oder modifiziertes Genprodukt die Funktionen des nativen, chromosomal kodierten RNase P-Proteins vollständig ersetzen kann. Für die Transkriptionsanalyse wurde die RT-PCR-Methode (3.2.5.2) ausgewählt, da diese sehr sensitiv ist und auch noch geringste Mengen an mRNA in den Zellen detektiert werden können.

In den Stämmen d7[pDG148], d7[p4*coli*] und d7[p5*syn*] wurde die *rnpA*-Transkription in Abhängigkeit von Xylose analysiert. Die verwendeten *Primer* waren spezifisch für Sequenzen des *rnpA*-Gens von *B. subtilis* (RT1-duoC5 und RT2-duoC5 bzw. RT3-duoC5 und RT4-duoC5), *E. coli* (RT1-*coli*C5 und RT2-*coli*C5) oder *Synechocystis* (RT1-*syn*C5 und RT2-*syn*C5). Die für das *B. subtilis*-Gen spezifischen *Primer* detektierten die chromosomale *rnpA*-Expression und die für das *E. coli*- bzw. *Synechocystis*-Gen spezifischen *Primer* die plasmidale *rnpA*-Expression. Das vom *B. subtilis* *rnpA*-Gen amplifizierte RT-PCR-Fragment besaß eine Länge von 289 Bp (mit RT1-duoC5/RT2-duoC5) bzw. 201 Bp (mit RT3-duoC5/RT4-duoC5). Das vom *E. coli*-*rnpA*-Gen bzw. vom *Synechocystis*-*rnpA*-Gen amplifizierte Fragment war 302 Bp bzw. 301 Bp lang.

Zur Analyse wurden über Nacht angewachsene Zellkulturen jeweils zweimal mit Medium ohne Zusatz gewaschen, pelletiert und anschließend in einem kleinen Volumen Medium resuspendiert. Mit diesen Zellsuspensionen wurden schließlich Xylose- oder Glukose-haltige 50 ml-Kulturen angeimpft. Durch entsprechende Verdünnung wurde die OD₆₀₀ zu Beginn der Analyse in allen Zellkulturen auf etwa 0,2 eingestellt.

Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen in 4.1.7 zeigten, daß 250 min nach dem Transfer der d7-Zellen in Xylose-freies Medium keine chromosomal kodierte *rnpA*-mRNA mehr nachgewiesen werden kann. Folglich wurden die RNA-Präparationen für die RT-PCR-Analyse 5 Stunden nach dem Transfer der transformierten d7-Zellen in das mit Xylose oder Glukose supplementierte Medium angefertigt. Das *rpsR*-Gen wurde erneut als interner Standard verwendet (siehe auch 4.1.7). Da die *rnpA*-Transkription im jeweiligen Stamm in Abhängigkeit von Xylose (Induktion) oder Glukose (Repression) bestimmt und direkt miteinander verglichen werden sollte, war der Einsatz jeweils gleicher Mengen Templat-RNA für die Auswertung der RT-PCR-Analyse entscheidend. Die Länge des vom *rpsR*-Gen amplifizierten Fragments betrug 191 Bp. Ferner wurden die RNA-Präparationen in PCR-

Reaktionsansätzen ohne Reverse Transkriptase getestet. Diese Kontrollversuche sollten mögliche Kontaminationen mit DNA detektieren.

Das Ergebnis der RT-PCR-Analyse ist in Abbildung 4.16 gezeigt. Das durch den *xyl*-Promotor regulierte chromosomale *rnpA*-Gen in d7[pDG148], d7[p4*colI*] und d7[p5*syn*] wurde ausschließlich transkribiert, wenn die Bakterienzellen in Xylose-haltigem Medium wuchsen. Nach 5 Stunden Wachstum in Glukose-haltigem Medium, d.h. in Abwesenheit des Induktors Xylose, konnten mit den *B. subtilis*-spezifischen *Primern* keine Transkripte des chromosomalen *rnpA*-Gens mehr detektiert werden. Dagegen erfolgte die Transkription der plasmidalen *rnpA*-Gene von *E. coli* und *Synechocystis* unabhängig von Xylose. Die mRNAs dieser heterologen Gene konnten auch in Abwesenheit von Xylose mittels RT-PCR in den Zellen von d7[p4*colI*] und d7[p5*syn*] nachgewiesen werden. Bei dieser Analyse erfolgte keine IPTG-Induktion der *spac*-Promotor-regulierten plasmidalen Gene. Die mittels RT-PCR detektierten heterologen *rnpA*-Transkripte waren folglich Produkte der Basalexpression des *spac*-Promotors. Auch waren die Intensitäten der Banden der plasmidkodierten *rnpA*-Transkription bedeutend stärker als die der chromosomalen bei Xylose-Induktion. Die höhere Kopienzahl an plasmidalen *rnpA*-Genen in Verbindung mit der *spac*-Promotor-vermittelten Basalexpression führte in der Zelle auch ohne IPTG-Induktion zu einer starken Transkription der *rnpA*-Gene. Anhand des internen *rpsR*-Standards konnte bei der Gelanalyse ebenfalls gezeigt werden, daß in den jeweils miteinander verglichenen RT-PCR-Ansätzen - d.h. Gentranskription in Xylose- oder Glukose-haltigem Medium - annähernd gleiche Mengen Gesamt-RNA als Templat eingesetzt wurden. Die Bandenintensitäten der amplifizierten *rpsR*-Fragmente waren jeweils vergleichbar. Bei den Kontrollversuchen mittels PCR ohne Reverse Transkriptase wurden keine Fragmente amplifiziert, d.h. die für diese Analysen verwendeten RNA-Präparationen waren nicht mit DNA verunreinigt (Daten nicht gezeigt).

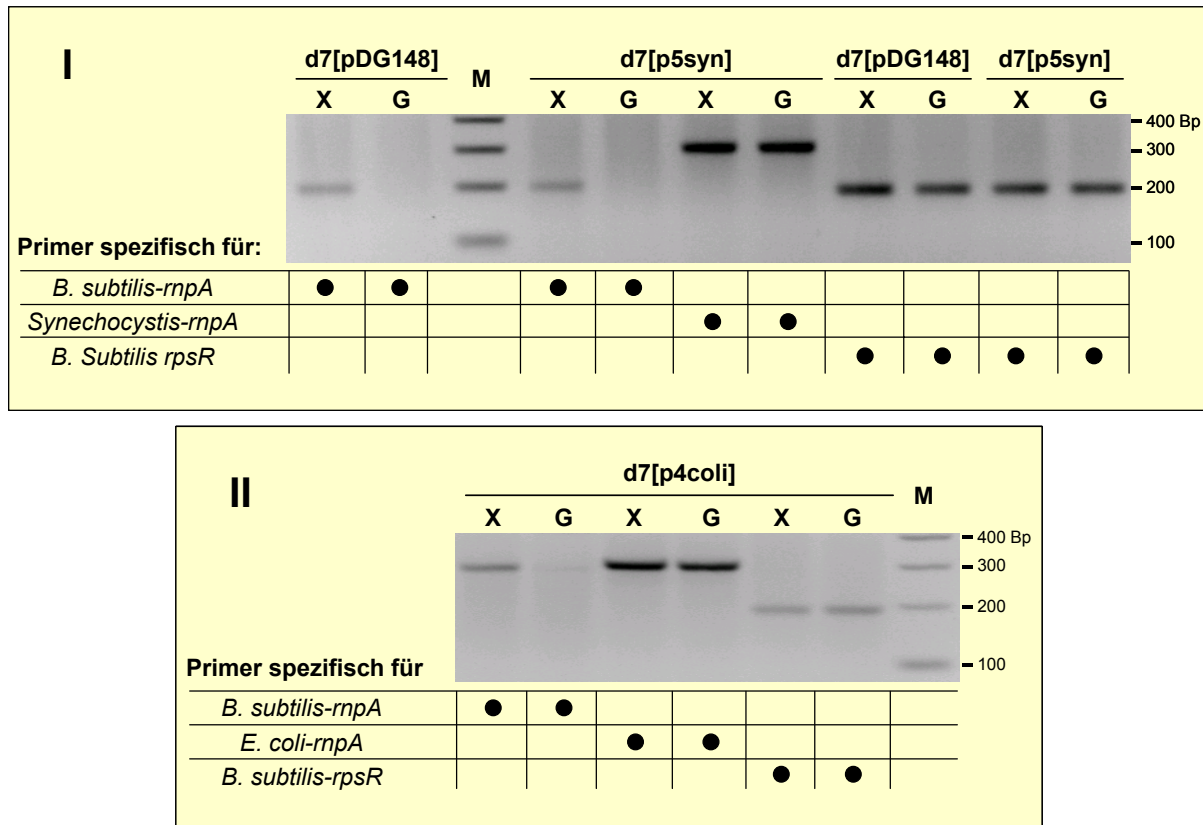


Abb. 4.16: Analyse der chromosomalen bzw. plasmidalen *rnpA*-Transkription in transformierten d7-Stämmen mittels RT-PCR. Nach 5 Stunden Wachstum in LB-Medium mit 2 % (w/v) Xylose (X) oder 2 % (w/v) Glukose (G) wurden die für die RT-PCR-Analyse verwendeten RNA-Präparationen angefertigt. Hiervon wurden jeweils 1,2 µg Gesamt-RNA als Templat verwendet. Bei der RT-PCR mit den *B. subtilis-rnpA* spezifischen *Primern* (in I und II) wird die chromosomale *rnpA*-Transkription, bei der RT-PCR mit den *Synechocystis*- (I) bzw. *E. coli*- (II) *rnpA* spezifischen *Primern* wird die plasmidale *rnpA*-Transkription der heterologen Gene detektiert. Die RT-PCR mit *rpsR*-spezifischen *Primern* ermöglichte einen Vergleich zwischen den jeweils als Templat eingesetzten Mengen Gesamt-RNA. Die amplifizierten Fragmente wurden auf einem 2,5 % igen Agarose-Gel analysiert. In den Spuren (M) wurden DNA-Größenstandards aufgetragen.

Schließlich konnte mit diesen RT-PCR-Analysen demonstriert werden, daß in Medium ohne Xylose wie beabsichtigt nur die plasmidkodierte *rnpA*-Gene von *E. coli* bzw. *Synechocystis* transkribiert wurden. Die Expression des chromosomalen *rnpA*-Gens, welches unter der Kontrolle des *xyl*-Promotors steht, wurde in Abwesenheit des Induktors Xylose effizient reprimiert und sollte somit keinen Einfluß auf den Phänotyp der transformierten d7-Zellen haben.

4.2.2.3 Identifizierung der heterologen RNase P-Proteine in den transformierten d7-Stämmen mittels *Western Blot*-Analyse

Mit den folgenden Analysen sollte gezeigt werden, daß die plasmidkodierten, heterologen RNase P-Proteine in den d7-Zellen synthetisiert werden. Für die immunochemische Identifizierung standen zwei spezifische Antiseren (Pascual und Vioque 1996) zur Verfügung, mit denen die RNase P-Proteine von *E. coli* bzw. *Synechocystis* in Immunoblot-Analysen detektiert werden konnten.

Zum Nachweis der heterologen RNase P-Proteine in den *B. subtilis*-Stämmen d7[p4*coli*] und d7[p5*syn*] wurde mittels der Trichloressigsäure- (TCA-)Proteinfällungs-Methode (3.2.6.1) Gesamtprotein der Stämme präpariert und anschließend in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (3.2.6.2) aufgetrennt, auf PVDF-Membranen elektrotransferiert (3.2.6.3) und mit dem entsprechenden spezifischen Antiserum immundetektiert (3.2.6.4). Die Auftrennung der Gesamtproteine erfolgte mittels SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1987) auf 13 %igen Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen). Da die verwendeten RNase P-Protein-spezifischen Antiseren zusätzlich mit vereinzelt Proteinen aus *B. subtilis* kreuzreagieren, wurde als Kontrolle Gesamtprotein aus d7[p3d] auf das Gel aufgetragen. Daß jeweils vergleichbare Mengen Gesamtprotein aufgetrennt wurden, wurde durch Elektrophorese und Coomassie-Färbung eines parallel dazu angefertigten, identisch beladenen Gels überprüft (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich der Immunoblots von d7[p3d] und d7[p4*coli*] bzw. d7[p5*syn*] war das jeweilige heterologe RNase P-Protein deutlich zu erkennen (Abb. 4.17). Beide Proteine (tatsächliche Molekulargewichte: *E. coli* 13,6 kDa, *Synechocystis* 14,5 kDa) zeigten ein leicht aberrantes Laufverhalten im SDS-Gel, das jedoch typisch für bakterielle RNase P-Proteine ist (Kole und Altman, 1981; Gardiner *et al.*, 1985). Erstaunlicherweise kreuzreagierten die Antiseren nicht mit dem RNase P-Protein aus *B. subtilis*. Wie bereits in 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben, stehen die *mpA*-Gene auf den Expressionsplasmiden p3d, p4*coli* und p5*syn* unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *spac*-Promotors. Die Stämme d7[p3d], d7[p4*coli*] und d7[p5*syn*] wurden jedoch vor der Proteinpräparation nicht mit IPTG induziert.

In Verbindung mit den Ergebnissen aus 4.2.2.1 und 4.2.2.2 kann somit der Schluß gezogen werden, daß sowohl das RNase P-Protein von *E. coli* als auch das von *Synechocystis* alle essentiellen Funktionen des nativen RNase P-Proteins in *B. subtilis* übernehmen kann.

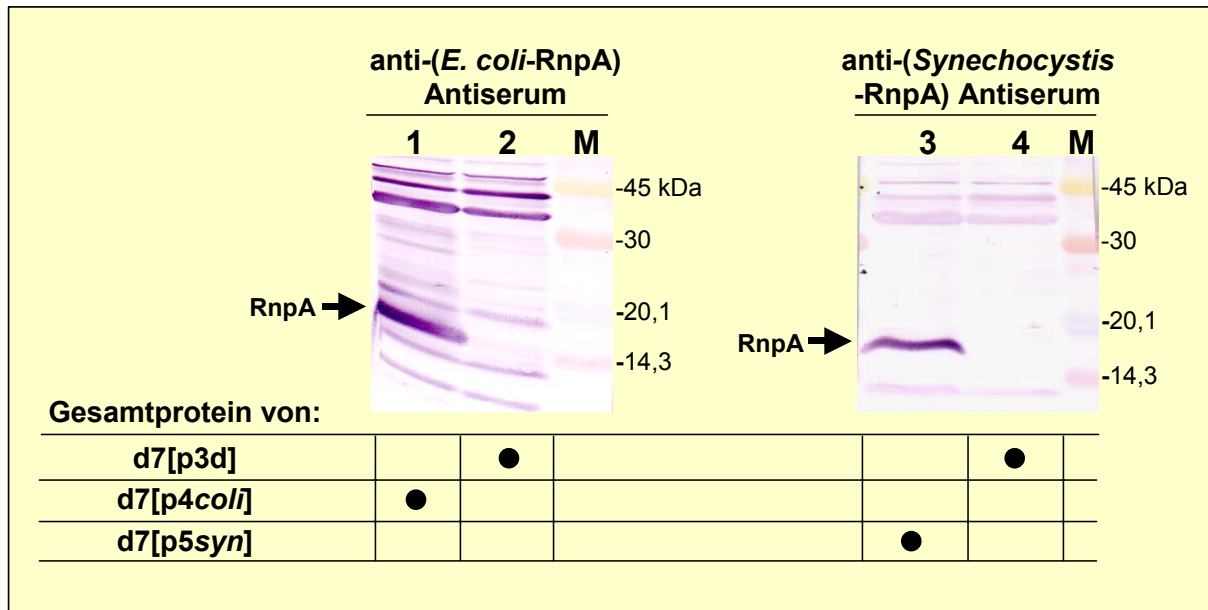


Abb. 4.17: Western Blot-Analyse zum Nachweis der heterologen RNase P-Proteine in den transformierten d7-Stämmen. Analysiert wurde durch TCA-Fällung präpariertes Gesamtprotein aus d7[p3d] (Spur 2 + 4), d7[p4coli] (Spur 1) und d7[p5syn] (Spur 3). M = Molekulargewichtsmarker. Die immundetektierten heterologen RNase P-Proteine (RnpA) sind mit einem Pfeil markiert. Nach der Auftrennung auf einem 13 % SDS-PAA-Gel (nach Schägger und Jagow) und Elektrobotten auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immundetektion mit Antiserum gegen RNase P-Protein von *E. coli* (Spur 1 + 2) oder *Synechocystis* (Spur 3 + 4). Primärantikörper-Verdünnung 1 : 900 (Antiserum aus Kaninchen); Sekundärantikörper-Verdünnung 1 : 4.000 (Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, gekoppelt an Alkalische Phosphatase).

Zusammenfassend konnte durch die Komplementationsanalysen mit den heterologen RNase P-Proteinen demonstriert werden, daß der d7-Stamm für heterologe Komplementationsanalysen geeignet ist. Durch die Komplementationsanalyse mit dem RNase P-Protein aus *E. coli* konnte zudem erstmals gezeigt werden, daß die Proteinkomponente einer Typ A RNA-Untereinheit mit der Typ B RNA-Untereinheit auch *in vivo* ein funktionierendes Hybridenzym bilden kann. Dieses Hybridenzym kann alle essentiellen Aufgaben in *B. subtilis* erfüllen. Gleichmaßen konnte die Proteinuntereinheit der RNase P aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* ein *in vivo* funktionierendes RNase P-Hybridenzym mit der RNA-Untereinheit aus *B. subtilis* bilden. Die postulierte phylogenetische Verwandtschaft zwischen Cyanobakterien und Cyanellen (Baum et al., 1996) ist ein weiterer interessanter Aspekt dieser Komplementationsstudie mit dem RNase P-Protein aus *Synechocystis*. Cyanellen sind intrazelluläre Endosymbionten von Protozoen und entsprechen funktionell den Chloroplasten. Morphologisch und molekulargenetisch stellen sie eine Zwischenstufe in der Evolution von Cyanobakterien zu Chloroplasten dar, wobei die Chloroplasten höherer Pflanzen zumindest teilweise ihre RNase P-RNA-Komponente verloren zu haben scheinen (Gegenheimer, 1995; Thomas und Gegenheimer, 2000). Mit der RNase P-RNA der Cyanelle von *Cyanophora paradoxa*, die ohne Protein keine katalytische

Aktivität zeigt, und dem RNase P-Protein von *Synechocystis* konnte ein funktionelles Enzym rekonstituiert werden (Pascual und Vioque, 1999). Demnach könnte das RNase P-Enzym von Cyanellen – welches dem Enzym der Cyanobakterien strukturell und funktionell ähnlich zu sein scheint – das phylogenetische Bindeglied zwischen dem auf RNA basierenden Enzym der Bakterien und dem auf Protein basierenden Enzym der Chloroplasten höherer Pflanzen darstellen. Das Ergebnis der Komplementationsanalysen mit dem RNase P-Protein aus *Synechocystis* ist des Weiteren bemerkenswert, da sich die Substratbindung der RNase P aus Cyanobakterien von der aus anderen Bakterien unterscheidet (Pascual und Vioque, 1999). So besitzt die cyanobakterielle RNase P eine größere Präferenz für Substrate ohne 3'-terminale CCA-Sequenz, welche eine wichtige Determinante bei der Substratbindung in *E. coli* und *B. subtilis* ist (Seidman und McClain, 1975; Oh und Pace, 1994).

4.3 Aufreinigung von RNase P-Holoenzym aus Stamm d7

Die Produktion und Aufreinigung größerer Mengen RNase P-Holoenzym kann für verschiedene Anwendungen nützlich sein, wie z.B. Kristallisationsstudien. Bislang existieren von der RNase P aus *B. subtilis* eine Kristallstruktur der Proteinuntereinheit sowie der Spezifitätsdomäne der RNA-Untereinheit (Stams et al., 1998; Krasilnikov et al., 2003). Die Strukturaufklärung des kompletten RNase P-Holoenzym, von der man sich wichtige Hinweise auf den Mechanismus der proteinunterstützten RNA-Katalyse erhofft, steht jedoch noch aus. Zudem ist es wünschenswert, *in vivo* rekonstituiertes Holoenzym für biochemische Analysen zu verwenden, da denkbare unbekannte post-transkriptionale bzw. post-translationale Modifikationen oder die Interaktion mit bislang unbekannten Molekülen einen Einfluß auf den Zusammenbau bzw. die Enzymatik des RNase P-Komplexes haben könnten.

Mit dem d7-Stamm ist ein Zellsystem verfügbar, aus dem *in vivo* rekonstituierte RNase P-Holoenzyme mit nativen, mutierten oder heterologen Proteinuntereinheiten in größerem Maßstab aufgereinigt werden können. Eine Strategie zur Isolierung von RNase P-Holoenzymen aus diesem Stamm basiert darauf, das plasmidkodierte P-Protein mit einer terminalen Folge von Histidinen - einem sogenannten *His-tag* - zu versehen. Dadurch sollte die Affinitätsreinigung der Proteinuntereinheit - die sich unter nativen Bedingungen im Komplex mit der RNA-Untereinheit befindet - mittels einer Ni^{2+} -Nitrilotriacetat-Matrix ermöglicht werden, um das RNase P-Holoenzym in wenigen Arbeitsschritten isolieren und von Verunreinigungen befreien zu können. Das plasmidal kodierte *rnpA*-Gen sollte auch für diesen Zweck unter die Kontrolle des IPTG-induzierbaren *spac*-Promotors gestellt werden, um die Möglichkeit einer zusätzlichen Erhöhung der Expression durch IPTG-Induktion zu haben.

Es ist denkbar, daß die Expressionsraten von Protein- und RNA-Untereinheit der RNase P auf Transkriptionsebene koordiniert werden. Danach könnte eine erhöhte Expressionsrate der Proteinuntereinheit - als Folge der in mehreren Kopien in der Zelle vorliegenden plasmidalen *rnpA*-Gene - ebenfalls eine erhöhte Expression der RNA-Untereinheit induzieren. Sollte dies nicht der Fall sein, so könnte eine größere Ausbeute an RNase P-Holoenzym dadurch erzielt werden, daß die RNA-Untereinheit - ebenfalls plasmidkodiert - überexprimiert wird.

4.3.1 Überexpression und Nachweis des P-Proteins in Stamm d7

Zunächst sollte das mit einem *His-tag* versehene P-Protein überexprimiert werden. Da in seiner nativen Konformation vorliegendes und somit funktionstüchtiges RNase P-Holoenzym aufgereinigt werden sollte, war es wichtig, daß der *His-tag* keinen Einfluß auf die Ausbildung essentieller Sekundär- oder Tertiärstrukturen des Proteins besitzt. Folglich mußte zunächst in Komplementationsanalysen untersucht werden, ob eine solche terminale Verlängerung des P-Proteins von *B. subtilis* Auswirkungen auf dessen Funktionalität *in vivo* besitzt. Eine analog hierzu durchgeführte N-terminale Verlängerung des RNase P-Proteins von *E. coli* um 12 Aminosäuren (davon 6 Histidine) zeigte zumindest keine negativen Auswirkungen auf dessen Funktionalität in Rekonstitutionsexperimenten (Rivera-Lèon et al., 1995).

Zur Überexpression des P-Proteins wurden zwei Konstrukte hergestellt. Bei dem ersten Konstrukt wurde die Oligo-Histidin-kodierende Sequenz an das 3'-Ende des *rnpA*-Gens angefügt. Das daraus resultierende Protein besaß demnach einen C-terminalen *His-tag*. Zu diesem Zweck wurden in einer zweistufigen PCR-Reaktion mit den *Primer*-Paaren kom-duo-5/p3d-His1-3 und kom-duo-5/p3d-His2-3 36 Nukleotide an das 3'-Ende des *rnpA*-Gens angefügt. Bei der ersten PCR-Reaktion diente das Expressionsplasmid p3d als Templat. Bei diesem Plasmid war zwischen *spac*-Promotor und *rnpA*-Gen noch das durch Deletion inaktivierte *rpmH*-Gen ($\Delta rpmH$) sowie die intergenische Sequenz insertiert. Das aus den zwei Amplifikationsrunden resultierende 682 Bp lange Konstrukt bestand somit aus dem $\Delta rpmH$ -Gen, der intergenischen Sequenz und dem veränderten *rnpA*-Gen, vor dessen Stopkodon 8 Histidinkodons insertiert waren. Die verwendeten *Primer* kom-duo-5 und p3d-His2-3 kodierten außerdem die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme Hind III und Kpn I. Über diese Restriktionsschnittstellen konnte das $\Delta rpmH::rnpA$ -Fragment aus Plasmid p3d durch das neu konstruierte ersetzt werden. Das neu entstandene Expressionsplasmid, welches für ein P-Protein mit einem C-terminalen *His₈-tag* kodierte, wurde als p3dcHis bezeichnet. Wie in 4.1.5 diskutiert, war hier mit einer abgeschwächten Expression des

RNase P-Proteins zu rechnen. Bei dem zweiten Konstrukt wurde das *rnpA*-Gen direkt unter die Kontrolle des *spac*-Promotors gestellt, um eine höhere Expressionsrate zu erzielen. Hier waren die Histidin-kodierenden Sequenzen am 5'-Ende des *rnpA*-Gens insertiert, so daß das kodierte Protein einen N-terminalen *His-tag* besaß. Außerdem wurde das natürlich vorhandene GUG-Startkodon gegen das effizientere AUG-Startkodon ausgetauscht. Als Templat für die PCR-Amplifikation mit den *Primern* 5-N-His_*rnpA* und 3-N-His_*rnpA* diente das in Hansen et al., 2001 beschriebene pQE-30 Plasmid mit insertierter und entsprechend modifizierter *rnpA*-Sequenz von *B. subtilis*. Das von diesem Plasmid kodierte P-Protein weist die N-terminale Leitsequenz MRGSHHHHHHGS auf. Die mit den *Primern* 5-N-His_*rnpA* und 3-N-His_*rnpA* generierten Restriktionserkennungssequenzen Xba I und Sph I ermöglichten die Insertion des 424 Bp langen Amplifikats in das entsprechend geschnittene pDG148-Plasmid. In dem resultierenden Expressionsplasmid p3nHis betrug der Abstand zwischen *Shine-Dalgarno* Sequenz und AUG-Startkodon 11 Basenpaare. Mit p3dcHis und p3nHis standen somit zwei *rnpA*-Expressionsplasmide zur Verfügung, mit denen unterschiedliche Expressionsraten in *B. subtilis* erzielt werden konnten. Die niedrigste Expressionrate sollte theoretisch mit p3dcHis ohne IPTG-Induktion erhalten werden (\equiv Basalexpression), die stärkste mit p3nHis nach Induktion mit IPTG.

Nach der Überprüfung durch Sequenzierung wurde der *B. subtilis* Stamm d7 mit den Expressionsplasmiden p3dcHis und p3nHis elektrotransformiert. In beiden Fällen konnten Transformanten mit dem jeweils gewünschten Plasmid isoliert werden. Anschließend mußte getestet werden, ob die mit einem Oligo-Histidin-Anker versehenen P-Proteine das native Protein komplementieren können. Hierzu wurden die mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformierten d7-Zellen auf LB-Platten ohne Xylose ausplattiert. Beide Stämme – d7[p3dcHis] und d7[p3nHis] – konnten bei reprimiertem chromosomalen *rnpA*-Gen wachsen (Daten nicht gezeigt). Die *in vivo*-Funktionalität der beiden mit einem Oligo-Histidin-Anker versehenen P-Proteine konnte somit bestätigt werden.

Die Expression der plasmidalen *rnpA*-Gene wurde schließlich auf Proteinebene mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Als Kontrolle diente der Stamm d7[pDG148], der mit dem Vektor ohne Insert transformiert war. Für die Gesamtproteinpräparation von d7[pDG148], d7[p3dcHis] und d7[p3nHis] wurden jeweils 100 ml-LB-Flüssigmedium mit einer entsprechenden Starterkultur angeimpft und bis zur späten logarithmischen Phase bei 180 rpm/37 °C geschüttelt. Daraufhin wurden die Zellen zur Überexpression der plasmidkodierten P-Proteine mit IPTG induziert. Nach einer weiteren Inkubation für 90 min bei 37 °C/180 rpm wurden die Zellen pelletiert. Das Gesamtprotein wurde dann aus jeweils 0,6 g Zellpellet (Naßgewicht) mittels der TCA-Proteinfällungsmethode präpariert und einer Immunoblot-Analyse unterzogen (Abb. 4.18). Zur Immundetektion wurden sowohl das von C. A. Fierke (University of Michigan, U.S.A) zur Verfügung gestellte P-Protein-spezifische polyklonale

Antiserum „P.ab syra 6“ als auch ein monoklonaler Anti-Histidin-Antikörper (Penta•His™ Antibody, Qiagen; erkennt fünf aufeinanderfolgende Histidinseitenketten) verwendet. Die Verwendung dieser Antikörper sollte einerseits die Identifizierung des P-Proteins ermöglichen und andererseits den Nachweis erbringen, daß der *His-tag* an den plasmidkodierten Proteinen vorhanden ist.

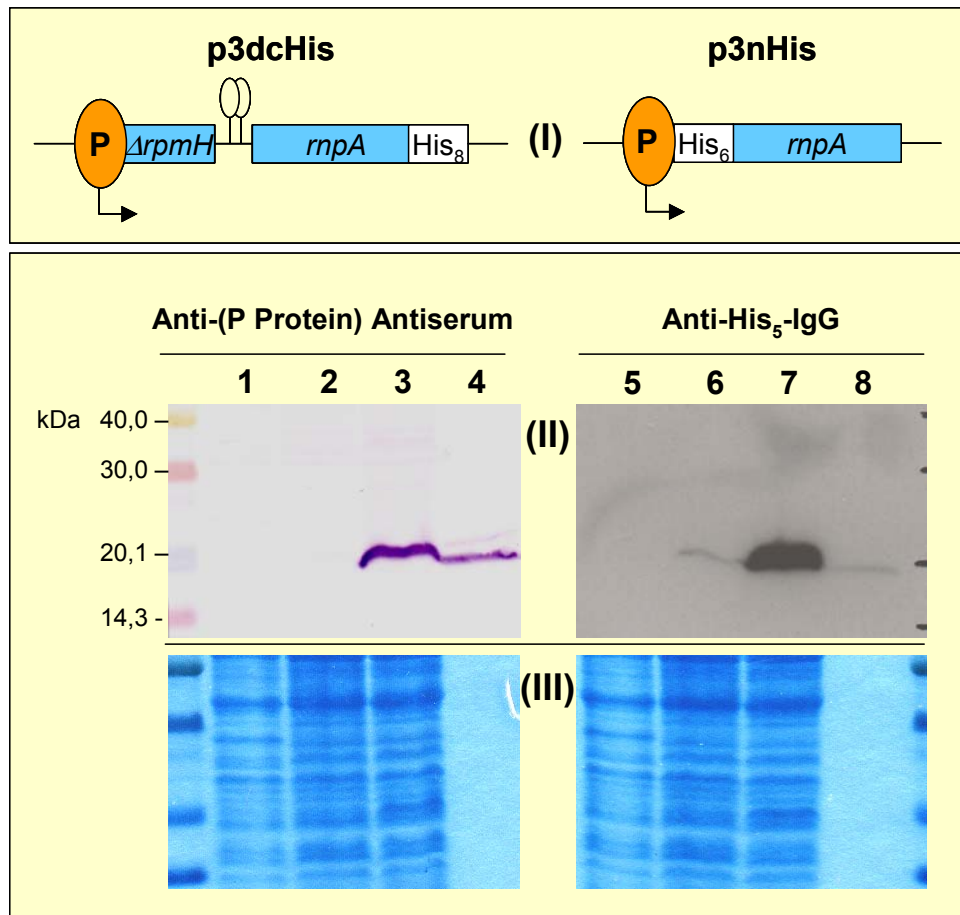


Abb. 4.18: *Western Blot*-Analyse zur Expression der mit einem Oligo-Histidin-Anker versehenen P-Proteine in Stamm d7. Nach der TCA-Proteinfällung wurden vergleichbare Mengen Gesamtprotein von d7[pDG148] (Spur 1 + 5), d7[p3dcHis] (Spur 2 + 6) und d7[p3nHis] (Spur 3 + 7) auf ein 13 %iges SDS-PAA-Gel (nach Schagger & Jagow) aufgetragen. Als spezifischer Größenmarker wurden 60 ng rekombinantes P-Protein mit N-terminalem *His₆-tag* aufgetragen (Spur 4 + 8). (I) Schematische Darstellung der modifizierten *mpA*-Gene in den Plasmidkonstrukten p3dcHis (kodiert P-Protein mit C-terminalem *His₈-tag*) und p3nHis (kodiert P-Protein mit N-terminalem *His₆-tag*). P in orangem Oval: IPTG-induzierbarer *spac*-Promotor mit Transkriptionsrichtung (Pfeil); $\Delta rpmH$: durch Deletion (\Rightarrow Stopkodons) inaktiviertes Gen für L34; *His₈* bzw. *His₆*: Oligo-Histidin-Anker; Haarnadelschleifen: Sequenzen für potentielle Transkriptionsterminatoren. (II) *Western Blot* nach Immundetektion. Primärantikörper-Verdünnung 1 : 2.500 (Anti-P-Protein Antiserum „P.ab syra 6“) bzw. 1 : 1.000 (monoklonale Anti-*His₅* IgG1). Sekundärantikörper-Verdünnung 1 : 4.000 (Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, gekoppelt an Alkalische Phosphatase) in den Spuren 1 - 4 bzw. 1 : 5.000 (Anti-Maus-IgG aus Ziege, gekoppelt an Peroxidase) in den Spuren 5 - 8. (III) Entsprechende mit *Coomassie Blue* gefärbte SDS-Gele.

Wie anhand der Immunoblot-Analyse in Abbildung 4.18 II zu erkennen ist, war die Expressionsrate der mit einem *His-tag* versehenen P-Proteine in den Stämmen d7[p3dcHis] und d7[p3nHis] stark unterschiedlich. Das P-Protein wurde von Expressionsvektor p3nHis (Spur 3 + 7) bedeutend stärker exprimiert als von Expressionsvektor p3dcHis (Spur 2 + 6). Während durch Verwendung des Anti-P-Protein Antiserums „P.ab syra 6“ in Kombination mit Alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpern (Spuren 1 - 4) in dem Gesamtprotein von d7[p3dcHis] kein P-Protein immundetektiert werden konnte (Spur 2), war bei Gebrauch des monoklonalen Anti-*His*₅-Antikörpers in Kombination mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (Spuren 5 - 8) eine schwache immunreaktive Bande in Spur 6 erkennbar. Peroxidasemarkierte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen damit eine Chemilumineszenz aus. Diese ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Reaktion ist etwa 10-mal sensitiver als die Blotentwicklung mit Alkalischer Phosphatase-Reaktion. Folglich kann daraus abgeleitet werden, daß die Sensitivität des polyklonalen Antiserums „P.ab syra 6“ in Verbindung mit den Alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpern zum Nachweis des P-Proteins in d7[p3dcHis]-Zellen nicht ausreichend war. Die Menge an chromosomal exprimiertem P-Protein in den mit dem Kontrollvektor pDG148 transformierten d7-Zellen (Spur 1) lag ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze für diese Antikörper-Kombination. Als Kontrolle wurden auch 60 ng aufgereinigtes, rekombinantes P-Protein mit N-terminalem *His*₆-tag aufgetragen (Spur 4 + 8). Bei der Detektion mit den monoklonalen Anti-*His*₅-Antikörpern waren die immunreaktiven Banden in Spur 6 (Gesamtprotein aus d7[p3dcHis]) und Spur 8 (60 ng rekombinantes P-Protein mit N-terminalem *His*₆-tag) vergleichbar stark. Mit dem Anti-P-Protein Antiserum hingegen konnte nur das aufgereinigte P-Protein (Spur 4) immundetektiert werden, nicht jedoch das P-Protein in Gesamtprotein aus d7[p3dcHis] (Spur 2). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die Sensitivität des Antiserums „P.ab syra 6“ im Kontext des Gesamtproteins reduziert wird und geringere Mengen P-Protein nur in aufgereinigtem Zustand immundetektiert werden können. Zudem ist es denkbar, daß die Bindung der Penta•HisTM Antikörper an den C-terminalen *His*₆-tag effektiver ist als an den N-terminalen *His*₆-tag. In den in (III) dokumentierten, mit *Coomassie Blue* gefärbten Gelen ist gezeigt, daß jeweils vergleichbare Mengen Gesamtprotein für die beiden Blots verwendet wurden. Für die Überexpression von Histidin-markiertem P-Protein in Stamm d7 wurde folglich das Plasmidkonstrukt p3nHis verwendet.

4.3.2 Isolierung des P-Proteins mit N-terminalem Oligo-Histidin-Anker unter denaturierenden Bedingungen

In den vorherigen Untersuchungen konnte der Nachweis erbracht werden, daß das mit einem *His-tag* versehene, plasmidkodierte P-Protein in Stamm d7[p3nHis] überexprimiert wird. Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob eine affinitätschromatographische Aufreinigung gemäß 3.2.6.6 prinzipiell durchführbar ist.

Hierfür wurde eine 50 ml-Kultur von d7[p3nHis]-Zellen bis zur späten logarithmischen Phase bei 37 °C/180 rpm wachsen gelassen und zur Überexpression des P-Proteins mit IPTG induziert. Nach 90 min Expressionsdauer wurde von den Zellen entsprechend 3.2.6.1 Gesamtprotein präpariert und 90 min bei Raumtemperatur mit Ni^{2+} -Nitrilotriacetat (NTA)-Sephrose in einem Gesamtvolumen von 5 ml inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend in ein leeres PD-10-Säulengehäuse gegeben und für die Elution vorbereitet. Nach gründlichem Waschen mit TUS-Puffer/12 mM Imidazol wurden die gebundenen Proteine schließlich mit 200 µl 0,5 M Imidazol eluiert. Die Effizienz der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (3.2.6.2) und Immunoblot-Analyse (3.2.6.3/4) bewertet. Hierfür wurden jeweils 18 µl der einzelnen Fraktionen auf ein 13 %iges SDS-PAA-Gel aufgetragen.

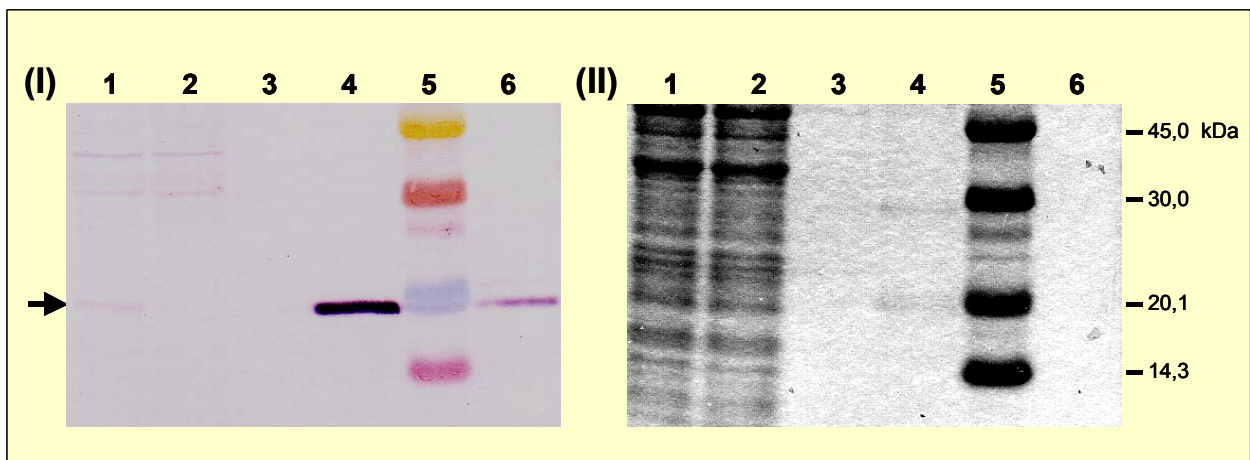


Abb. 4.19: *Western Blot*-Analyse und *Coomassie*-Färbung eines SDS-PAA-Gels zur P-Protein-Isolierung unter denaturierenden Bedingungen. Das Gesamtprotein für die Analyse wurde mittels TCA-Fällung aus d7[p3nHis]-Zellen präpariert und affinitätschromatographisch mittels einer Ni^{2+} -NTA-Matrix (Ni^{2+} -NTA-Superflow von Qiagen) aufgereinigt: Gesamtprotein (Spur 1), nicht-gebundene Proteinfraction (\equiv 1. Säulendurchlauf; Spur 2), Waschfraction (Spur 3) und Elutionsfraction (Spur 4) wurden auf einem 13% SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Als Größenvergleich diente ein Proteinstandard (Spur 5) und 50 ng rekombinantes P-Protein mit N-terminalem *His*₆-tag (Spur 6). (I) *Western Blot*-Analyse mit dem P-Protein-spezifischen Antiserum „P.ab syra 6“ aus Kaninchen (1 : 3.000). Als Sekundärantikörper-Konjugat wurden Alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (1 : 4.000) verwendet. Die Position des immunreaktiven P-Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (II) *Coomassie*-Färbung eines identisch zu (I) beladenen SDS-PAA-Gels.

Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, gelang mittels der hier verwendeten affinitätschromatographischen Methode eine partielle Aufreinigung und Ankonzentrierung des mit einem aminoterminalen *His₆-tag* gekoppelten P-Proteins unter denaturierenden Bedingungen. Dies verdeutlichte ein Vergleich von Spur 1 (Gesamtproteinfraktion) mit Spur 4 (Elutionsfraktion) des Immunoblots bzw. *Coomassie*-gefärbten SDS-PAA-Gels. In diesen Gelen zeigte das P-Protein ein apparentes Molekulargewicht von etwa 18 kDa, das recht gut mit dem tatsächlichen Molekulargewicht von 15,3 kDa übereinstimmt, wenn man das aberrante Laufverhalten bakterieller RNase P-Proteine berücksichtigt (Kole und Altman, 1981; Gardiner *et al.*, 1985). Auch muß man in Rechnung stellen, daß es sich bei dem verwendeten Proteinstandard um einen sogenannten „*prestained*“ Proteinmarker handelte. Hier sind die Standard-Proteine kovalent an einen Farbstoff gekoppelt, der das Laufverhalten im Gel ebenfalls beeinflussen kann. Zudem beziehen sich die Herstellerangaben zu den Molekulargewichten immer auf das Laufverhalten der vorgefärbten Markerproteine in einem SDS-PAA-Gel nach Laemmli (1970). In Relation zu den verwendeten Markerproteinen waren folglich nur bedingt Aussagen über das Molekulargewicht der in dieser Analyse aufgetrennten Proteine möglich.

In der Elutionsfraktion (Spur 4) des *Coomassie Blue*-gefärbten Gels ist schwach eine Protein-Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 18 kDa sichtbar (im originalen Gel sichtbar). Hierbei handelte es sich vermutlich um das eluierte P-Protein. Geht man davon aus, daß die Nachweisgrenze für Proteine in PAA-Gelen bei der Färbung mit *Coomassie Blue* bei 200-400 ng Protein/Bande liegt, so würde sich im vorliegenden Fall nach IPTG-Induktion von d7[p3nHis]-Zellen eine Ausbeute von 4-8 µg P-Protein/g Zellpellet (Naßgewicht) berechnen.

Auch war in der Elutionsfraktion (Spur 4) eine weitere Protein-Bande bei ca 30 kDa auf dem mit *Coomassie Blue* gefärbten Gel erkennbar, die im Immunoblot keine Immunreaktivität hervorrief. Da die Affinitätsreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, handelte es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um ein mit dem P-Protein interagierendes Protein. Es muß folglich davon ausgegangen werden, daß die Elutionsfraktionen mit weiteren Proteinen kontaminiert sind, die ebenfalls an die Ni²⁺-NTA-Matrix binden können (z.B. Metalloproteasen oder histidinhaltige Proteine).

4.3.3 Aufreinigung von RNase P-Holoenzym aus Stamm d7 nach Überexpression von Protein-/und RNA-Untereinheit

Zur Gewinnung von aktivem *in vivo* rekonstituiertem RNase P-Holoenzym mußte die affinitätschromatographische Aufreinigung schließlich unter nativen Bedingungen durchgeführt werden. In diesem Fall liegt das Histidin-markierte P-Protein zellulär im Komplex mit der RNA-Untereinheit der RNase P (P-RNA) vor. Allerdings war es unter diesen Bedingungen denkbar, daß der *His-tag* aufgrund der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des P-Proteins oder der Quartärstruktur des Komplexes maskiert ist und infolgedessen die Aufreinigung mittels der Ni^{2+} -NTA-Matrix beeinträchtigt wird. Dies sollte im Folgenden untersucht werden.

Die Aufreinigung von RNase P-Holoenzym - vermittelt durch Bindung der Histidin-markierten Proteinuntereinheit an die Ni^{2+} -NTA-Matrix - wurde im sogenannten *batch*-Verfahren gemäß 3.2.6.7 durchgeführt. Die Aktivitätsanreicherung wurde anschließend über die katalytische Prozessierungsaktivität der isolierten RNase P bestimmt.

Wie unter 4.3.1 nachgewiesen, unterschieden sich in den Stämmen d7[p3cHis] und d7[p3nHis] die intrazellulären Konzentrationen an Histidin-markiertem P-Protein. Eine erhöhte Konzentration an RNase P-Holoenzym – und demzufolge auch eine erhöhte katalytische Aktivität – bedingt jedoch auch das Vorhandensein einer ausreichenden Menge an P-RNA-Molekülen in der Zelle. Zur Produktion größerer Mengen RNase P-Holoenzym in Stamm d7 wurde folglich beabsichtigt, neben der Proteinuntereinheit auch die RNA-Untereinheit plasmidal zu überexprimieren. Hierzu wurde das *rnpB*-Gen von *B. subtilis* – welches für die P-RNA kodiert – zusätzlich in den P-Protein-Expressionsvektor p3nHis insertiert. Für die Konstruktion des Expressionsplasmids wurde zunächst das chromosomale *rnpB*-Gen von *B. subtilis*-Stamm SBB318 (von C. Condon, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Frankreich; zur Verfügung gestellt) - welches ebenfalls unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *spac*-Promotors steht - PCR-amplifiziert. Mittels der dafür verwendeten *Primer* 5'-Bs *rnpB* und 3'-Bs *rnpB* wurden an den Enden des 553 Bp langen amplifizierten Fragments *Swa* I-Erkennungssequenzen generiert. Dieses Fragment wurde schließlich nach Inkubation mit *Swa* I ungerichtet in das ebenfalls mit *Swa* I linearisierte p3nHis-Expressionsplasmid ligiert. Nach der Transformation in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen (3.2.2.1) konnten Klone isoliert werden. Bei allen mittels Restriktionsanalyse untersuchten Transformanten war die Transkriptionsrichtung der beiden benachbarten Gene *rnpA* und *rnpB* entgegengesetzt. Das so konstruierte, durch Sequenzierung verifizierte Expressionsplasmid „p3nHis+*rnpB*“ wurde mittels Elektrottransformation in den *B. subtilis*-Stamm d7 eingebracht und - nach vorangegangener Plasmidpräparation - einzelne

Transformanten einer Restriktionsanalyse unterzogen. Auf diese Weise konnte der gewünschte Stamm d7[p3nHis+rnpB] identifiziert und isoliert werden.

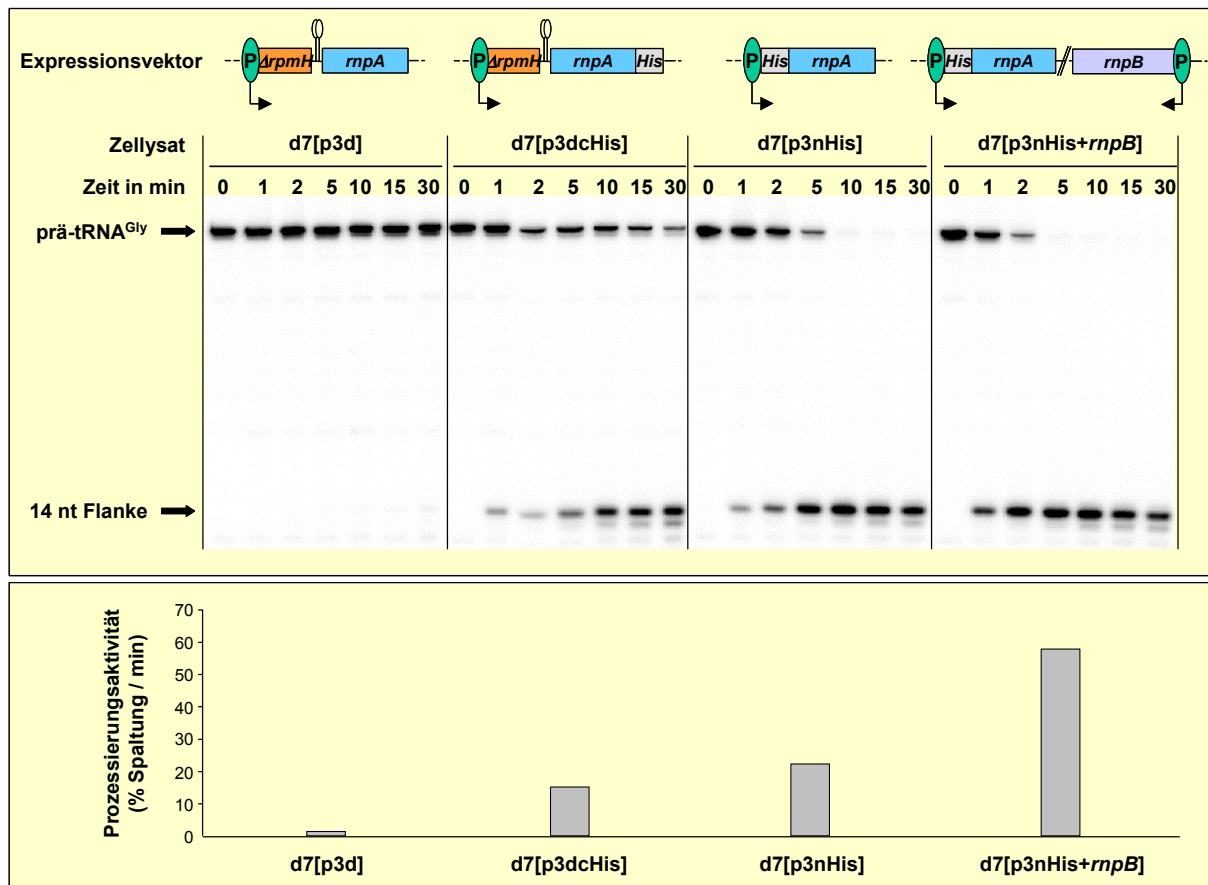


Abb. 4.20: Aktivitätstest nach Anreicherung von RNase P aus Zellysat. Gezeigt ist das Autoradiogramm eines 20 % PAA/8 M Harnstoff-Gels. Darüber sind schematisch die relevanten kodierenden Bereiche der jeweiligen Expressionsvektoren dargestellt. Nach der Inkubation mit Zellysat aus d7[p3d], d7[p3dcHis], d7[p3nHis] oder d7[p3nHis+rnpB] wurde die Ni^{2+} -NTA-Matrix (Ni^{2+} -NTA-Superflow von Qiagen) mit prä-tRNA^{Gly} aus *Thermus thermophilus* inkubiert. Die Substratkonzentration im Reaktionsansatz betrug 100 nM (≈ 12.500 cpm). Durch RNase P-Aktivität wurde von dem prä-tRNA^{Gly}-Substrat eine 14 Nukleotide lange Flanke abgespalten. Die zu den angegebenen Zeitpunkten aus dem Reaktionsansatz entnommenen Aliquots wurden dann in Bezug auf den Substratumsatz analysiert. In der unteren Box ist die jeweilige Prozessierungsaktivität (% Substratspaltung/min) der an die Ni^{2+} -NTA-Sepharose adsorbierten RNase P im Histogramm gezeigt.

Schließlich wurde die RNase P aus den Zellysaten der Stämme d7[p3dcHis], d7[p3nHis] und d7[p3nHis+rnpB] affinitätschromatographisch entsprechend 3.2.6.7 angereichert. Die Expression der chromosomalen *rnpA*-Gene wurde durch Kultivierung der Stämme in Xylose-freiem Medium inhibiert. Dadurch wurde verhindert, daß die chromosomal kodierten P-Proteine in Konkurrenz zu den plasmidal kodierten, Histidin-markierten P-Proteinen Komplexe mit der P-RNA bilden. Die Zellysate wurden aus jeweils identischen Zellmengen hergestellt. Anschließend wurde die Anreicherungs-effizienz über die katalytische Aktivität, d.h. die prä-tRNA-Prozessierungsaktivität der an die Ni^{2+} -NTA-Matrix adsorbierten RNase P-

Moleküle, bestimmt. Als Substrat wurde eine *in vitro* transkribierte 5'-markierte prä-tRNA^{Gly} aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* verwendet. Durch RNase P-Aktivität wurde von dieser prä-tRNA eine 14 Nukleotide lange 5'-Flanke abgespalten. Die Trennung von nicht-prozessierter prä-tRNA^{Gly} und abgespaltener 5'-Flanke erfolgte auf einem 20 %igen Harnstoffgel (3.2.3.2). Die relativen Anteile der RNAs konnten dann mittels Autoradiographie bestimmt werden. Zur Kontrolle wurde der Aufreinigungsprozeß auch mit Zellysat von d7[p3d] durchgeführt. Da das von dem Expressionsvektor p3d kodierte P-Protein keinen *His-tag* besaß, sollte mittels der Ni²⁺-NTA-Matrix keine katalytische RNase P-Aktivität aus dem Zellysat von d7[p3d] isoliert werden können. Das Ergebnis des Aktivitätstests ist in Abbildung 4.20 gezeigt. Beim Vergleich der Anreicherungs-effizienzen mußte allerdings auch sichergestellt sein, daß der mittels Ultraschall durchgeführte Zellaufschluß bei den untersuchten Stämmen vergleichbar effektiv war. Dies wurde kontrolliert, indem die verschiedenen für den Aktivitätstest verwendeten Zellysatfraktionen auf SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und durch Immunoblot-Analysen bzw. Färbung der Gele mit *Coomassie Blue* überprüft wurden. Teil der in Abbildung 4.21 gezeigten Analyse waren auch Elutionsfraktionen, die im Anschluß an den Aktivitätstest durch Behandlung der proteinbeladenen Ni²⁺-NTA-Matrices mit 0,5 M Imidazol gewonnen wurden.

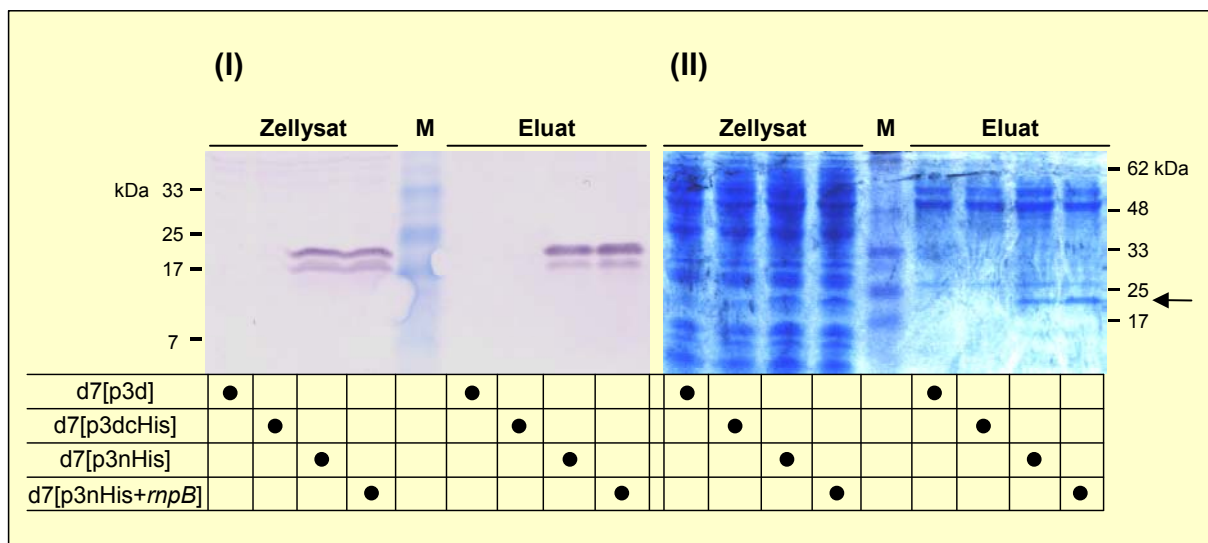


Abb. 4.21: Analyse der für den Aktivitätstest verwendeten Fraktionen mittels *Western Blot* und *Coomassie Blue*-Färbung. Zellysate und Elutionsfraktionen (präpariert von der für den Aktivitätstest verwendeten Ni²⁺-NTA-Sepharse) von d7[p3d], d7[p3dcHis], d7[p3nHis] und d7[p3nHis+mpB] wurden auf einem 13% SDS-PAA-Gel aufgetrennt. (I) *Western Blot*-Analyse mit dem P-Protein-spezifischem Antiserum „P.ab syra 6“ (1 : 2.500) und Alkalische Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpern (1 : 4.000). (II) Identisch zu (I) beladenes *Coomassie*-gefärbtes SDS-PAA-Gel. Der Pfeil markiert die Position des P-Proteins.

Wie erwartet konnte nach der Inkubation mit d7[p3d]-Zellysat keine signifikante prä-tRNA-Prozessierungsaktivität mit der Ni^{2+} -NTA-Matrix isoliert werden, d.h. ohne die Histidin-Markierung der P-Proteine erfolgte keine Bindung an die Affinitätsmatrix (Abb. 4.20). Eine dennoch vorhandene, in diesem Zeitfenster nicht erkennbare Restaktivität kann dadurch erklärt werden, daß die RNase P nicht vollständig ausgewaschen werden konnte. Beim Vergleich der Aktivitätsanreicherung aus Zellysat von d7[p3dcHis] und d7[p3nHis] zeigte sich, daß durch eine höhere intrazelluläre P-Protein-Konzentration in d7[p3nHis] (siehe 4.3.2) auch eine um den Faktor $\sim 1,5$ höhere RNase P-Aktivität isoliert werden konnte. Da die Bindekapazität des eingesetzten Volumens Ni^{2+} -NTA-Sepharose (5-10 mg His_6 -Protein/ml Matrix) ausreichend groß war und die Geschwindigkeitskonstante der RNase P durch die unterschiedliche Positionierung der *His-tags* an die P-Proteine nicht verändert sein sollte, müßten die miteinander verglichenen prä-tRNA-Prozessierungsaktivitäten der jeweiligen Menge an adsorbierten RNase P-Holoenzym proportional sein. Folglich waren in d7[p3nHis] gegenüber d7[p3dcHis] noch überzählige P-RNA-Moleküle vorhanden, um mit den von p3nHis kodierten P-Proteinen Komplexe zu bilden. Der gegenüber d7[p3dcHis] nachgewiesene Überschuß an P-Protein in d7[p3nHis] (siehe Abb. 4.18) war jedoch bedeutend größer als der Unterschied in der Prozessierungsaktivität, so daß in d7[p3nHis] die intrazelluläre Konzentration an P-Protein bedeutend größer sein sollte als an P-RNA. Durch die zusätzliche Überexpression der RNA-Untereinheit in d7[p3nHis+*mpB*] konnte die Anreicherungs-effizienz an RNase P nochmals verbessert werden. Die aus den Zellysaten isolierten prä-tRNA-Prozessierungsaktivitäten unterschieden sich zwischen d7[p3nHis] und d7[p3nHis+*mpB*] etwa um den Faktor 3. Folglich war in den d7[p3nHis]-Zellen das Verhältnis P-Protein/P-RNA > 1 . Unterhalb der abgespaltenen 14-Nukleotid-Flanke waren nach längerer Inkubationsdauer zusätzliche Banden erkennbar. Dabei könnte es sich um Degradationsprodukte handeln, die durch nicht vollständig aus der Ni^{2+} -NTA-Matrix ausgewaschene Exonukleasen erzeugt wurden. Die mit den Zellysaten und Eluaten durchgeführten Kontrollen in Abbildung 4.21 zeigten, daß die Zellaufschlüsse vergleichbar effektiv waren. Auch wurden von den mit d7[p3nHis]- und d7[p3nHis+*mpB*]-Zellysat inkubierten Ni^{2+} -NTA-Matrices einander entsprechende Mengen P-Protein eluiert. Die in Abbildung 4.21 (I) bei Fraktionen von d7[p3nHis] und d7[p3nHis+*mpB*] erkennbaren immunreaktiven Banden unterhalb der prominenten P-Protein-Bande könnten durch einen teilweisen proteolytischen Abbau der terminalen Enden des P-Proteins erklärt werden. So konnten auf dem originalen Blot bei den Zellysaten zwei und bei den Eluaten eine (hier konnten nur P-Proteine mit C-terminal degradiertem Ende gebunden werden) zusätzliche Bande(n) erkannt werden.

Zusammenfassend war mit der konzipierten Methode eine Anreicherung von RNase P-Holoenzym aus Zellysat mit relativ wenigen Arbeitsschritten möglich. Durch die plasmidale

Überexpression beider RNase P-Untereinheiten konnten größere Mengen an Holoenzym isoliert werden. Die Sequenz des plasmidkodierten P-Proteins kann nach Bedarf verändert werden. Da die Expression des chromosomalen *mnpA*-Gens in Stamm d7 vollständig inhibierbar ist, können auf diese Weise *in vivo* rekonstituierte RNase P-Komplexe isoliert werden, die ausschließlich das modifizierte Protein enthalten.

4.4 Ausblick

Es konnte ein *B. subtilis*-Stamm konstruiert und charakterisiert werden, der ein reprimierbares chromosomales *mnpA*-Gen besitzt. Ferner wurde der Beweis geführt, daß dieser Stamm d7 für Komplementationsstudien und zur Überexpression eines affinitätschromatographisch leicht isolierbaren RNase P-Holoenzym verwendet werden kann.

Der Stamm d7 eignet sich besonders für *in vivo*-Funktionsstudien mit heterologen RNase P-Proteinen zur Identifizierung wichtiger Strukturelemente dieser Gruppe von RNA-Bindungsproteinen. Auch könnten hierdurch Informationen zu phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen einzelnen Bakterienspezies erhalten werden. Die Ergebnisse einer kürzlich durchgeführten Studie über die humane, nukleare RNase P deuten darauf hin, daß auch ein eukaryontisches RNase P-Protein ein interessanter Kandidat für die heterologen Komplementationsstudien in Stamm d7 sein könnte. So gelang es der Arbeitsgruppe von Nayef Jarrous erstmals, humane nukleare RNase P-Aktivität *in vitro* zu rekonstituieren (Mann et al., 2003). Neben der RNA-Untereinheit (H1 RNA) sind von den 10 bislang charakterisierten Proteinuntereinheiten der humanen RNase P nur Rpp21 und Rpp29 für die prä-tRNA-Prozessierungsaktivität *in vitro* essentiell. Unerwartet wurde bei diesen Analysen gefunden, daß die Proteinuntereinheit Rpp29 auch mit der RNase P-RNA von *E. coli* (M1 RNA) einen stabilen und katalytisch aktivierten Komplex bilden kann. Die ermittelten K_M -Werte für die Substratprozessierung durch M1/RnpA und M1/Rpp29 waren unter ähnlichen Rekonstitutionsbedingungen vergleichbar und deuten auf eine hohe Substrataffinität des M1/Rpp29-Komplexes hin. Ferner konnten je eine Kristall- und NMR-Struktur archaealer Homologe des RNase P-Proteins Rpp29 ermittelt werden (Boomershine et al., 2003; Sidote und Hoffman, 2003). Rpp29, dessen homologes Protein in der Hefe als Pop4 bezeichnet wird, konnte bisher in allen untersuchten archaealen und eukaryontischen Organismen auf genetischer Ebene identifiziert werden (Hartmann und Hartmann, 2003). In der Folge wird daher zur Vereinfachung nur die Bezeichnung Rpp29 für diese Gruppe homologer RNase P-Untereinheiten verwendet. Die Konservierung bestimmter hydrophober

Aminosäurereste weist darauf hin, daß sämtliche archaealen und eukaryontischen Rpp29-Proteine eine ähnliche β -Faltblattstruktur aufweisen. Trotz der fehlenden Homologie scheinen die Rpp29-Proteine und die bakteriellen RNase P-Proteine aufgrund der Studie von Mann et al. (2003) gemeinsame biochemische Eigenschaften zu besitzen. Daher wäre eine erfolgreiche heterologe Komplementation der *B. subtilis* d7-Mutante mit humanem Rpp29 (bzw. dessen Homologen) durchaus denkbar, was durch folgende Überlegungen unterstützt wird: (1) Vorläufige Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß das prä-tRNA-bindende Protein Rpp21 den D-Stamm-Loop der tRNAs erkennt, während Rpp29 – analog dem bakteriellen RNase P-Protein – mit der einzelsträngigen 5'-Leitsequenz in Kontakt tritt (Jarrous et al., 2001; Jarrous, nicht publizierte Daten). Rpp29 müßte hierfür im Bereich des stark konservierten katalytischen Zentrums der RNase P-RNA positioniert sein. (2) Zudem zeigten *Three-Hybrid*-Experimente, daß die Rpp29-Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens* direkt mit der RNase P-RNA interagieren (Jiang et al., 2001). Die vorgeschlagene Tertiärstruktur der eukaryontischen RNase P-RNA ist der katalytischen Kernstruktur der bakteriellen RNase P-RNA – insbesondere im Bereich um Helix P4 – sehr ähnlich. Mehrere Positionen in und um diese P4-Helix sind unter allen bakteriellen, archaealen und eukaryontischen RNase P-RNAs stark oder strikt konserviert. (3) Desweiteren konnte in diesem Zusammenhang umgekehrt demonstriert werden, daß die RNase P-RNA von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (*Euryarchaeota*) *in vitro* durch das P-Protein von *B. subtilis* aktiviert werden kann. In *M. thermoautotrophicus* wurden vier RNase P-Proteine – darunter Rpp29 und Rpr2p/Rpp21 – identifiziert. Der größere Proteinanteil in *M. thermoautotrophicus* im Vergleich zu Bakterien deutet folglich auf akzessorische Funktionen der zusätzlichen Proteinuntereinheiten hin. (4) Eine Hypothese ist, daß alle rezenten RNase P-Enzyme aus einem gemeinsamen RNA-Enzym hervorgegangen sind und im Laufe der Evolution ein Übergang zu einem Ribonukleoprotein-Enzym stattgefunden hat. Bacteria und Archaea, deren phylogenetische Entwicklungslinien sich früh voneinander getrennt haben, könnten dabei verschiedene Proteine rekrutiert haben, die im Fall von Rpp29 und dem bakteriellen P-Protein eine vergleichbare Funktionalität besitzen. Ein Beispiel hierfür ist das Gruppe I Intron aus *Tetrahymena thermophila*, dessen Faltung zum katalytischen Komplex durch zwei unterschiedliche Proteine unabhängig voneinander vermittelt werden kann (Atsumi et al., 2001).

Eventuell könnte auch eine Co-Expression von Rpp21 und Rpp29 in Stamm d7 in Erwägung gezogen werden. Wie bereits erwähnt konnte mittels *Gel-Shift* Analysen gezeigt werden, daß Rpp21 an prä-tRNA bindet. Auch kommt es in der Hefe zwischen Rpr2p/Rpp21 und Rpp29 zu einer starken Interaktion (Houser-Scott et al., 2002). Die RNase MRP ist eine Endoribonuklease, die an der Prozessierung von prä-rRNA beteiligt ist. In *Saccharomyces cerevisiae* besitzen die nuklearen Enzyme RNase P und RNase MRP verschiedene RNA-

Untereinheiten, jedoch sind acht der bekannten jeweils neun Proteinuntereinheiten identisch (Van Eenennaam et al., 1999). Nur die Rpp21-homologe Proteinkomponente (Rpr2p) ist RNase P-spezifisch. Es wäre demnach denkbar, daß eine Aufteilung essentieller Funktionen auf zwei Proteine stattgefunden hat. So könnte Rpp29 – welches eine Komponente der RNase P und RNase MRP ist - z.B. generelle Eigenschaften in RNA-Substraten erkennen und Rpp21 könnte für die tRNA-Prozessierung spezifische Funktionen ausüben. Ob solch eine Interaktion von zwei Proteinuntereinheiten – Rpp29 mit ca. 11 kDa und Rpp21 mit ca. 17 kDa - mit der bakteriellen P-RNA sterisch möglich ist, könnte experimentell untersucht werden.

Weiterhin gibt es einige Bakterienarten, deren RNase P-Proteinsequenzen sich auffallend von den übrigen unterscheiden. Das RNase P-Protein von *Desulfovibrio vulgaris* (δ -Proteobacteria) beispielsweise besitzt einen extrem verlängerten N-terminalen und C-terminalen Bereich. *Deinococcus radiodurans* (*Deinococcus*-Gruppe) und *Novosphingobium aromaticivorans* (α -Proteobacteria) weisen ebenfalls Verlängerungen des C-terminalen Bereichs auf. Allerdings ist hier die N-terminale Region gegenüber der von anderen RNase P-Proteinen stark verkürzt: das erste Sekundärstruktur-Element (Helix α 1) liegt unmittelbar am N-terminalen Ende. Ein weiterer variabler Bereich ist die Schleife zwischen den Sekundärstrukturelementen β 2 und β 3. Bei *Helicobacter pylori* (ϵ -Proteobacteria) bzw. den Cyanobakterien *Nostoc punctiforme* und *Anabaena* sp. PCC7120 ist dieser Sequenzabschnitt gegenüber dem von *B. subtilis* um jeweils 24 Aminosäuren verlängert. Bei anderen bakteriellen RNase P-Proteinen sind Bereiche hingegen stark verkürzt, so daß Sekundärstrukturelemente teilweise deletiert sind. Beispiele hierfür sind die RNase P-Proteine von *Chlorobium tepidum* (Grünes Schwefelbakterium) bzw. *Mycoplasma capricolum* (*Firmicutes*/*Mollicutes*)/*Ruminococcus albus* (*Firmicutes*)/*Acidithiobacillus ferrooxidans* (γ -Proteobacteria), deren N-terminales bzw. C-terminales Ende innerhalb der bei *B. subtilis*, *S. aureus* und *T. maritima* bestimmten terminalen Sekundärstruktur liegt. Die funktionelle Rolle solcher Varianzen ist nicht geklärt und könnte in *B. subtilis* d7 untersucht werden. Verlängerte Bereiche in der Schleife zwischen β 2 und β 3 bzw. am N- und C-Terminus könnten beispielsweise deletiert oder die verkürzten terminalen Bereiche durch entsprechend komplette Sekundärstrukturelemente aus anderen bakteriellen RNase P-Proteinen ersetzt werden. Anhand der Funktionalität der auf diese Weise veränderten Proteine in Stamm d7 sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Strukturelemente des RNase P-Proteins möglich sein. In diesem Zusammenhang wurden bereits in einem *E. coli* A49-Stamm - welcher die temperatursensitive *mnpA49*-Mutation (siehe auch nächster Abschnitt) aufweist - *in vivo* Komplementationsanalysen mit veränderten RNase P-Proteinen durchgeführt (Kim et al., 2000). Hier wurden unterschiedlich lange Deletionen in die N- und C-terminalen Enden des RNase P-Proteins eingeführt und es stellte sich heraus, daß die

Expressionsstärke und somit die intrazelluläre Konzentration des zu analysierenden Proteins ein wichtiger Faktor bei den Komplementationsstudien ist. Einige der deletierten Proteine konnten das chromosomale *rnpA*-Gen nur bei deren Überexpression komplementieren. Bei einer niedrigen Expressionsrate hingegen erfolgte mit diesen Proteinen *in vivo* keine Komplementation. Mit den in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Expressionsplasmiden können ebenfalls unterschiedliche *rnpA*-Expressionsraten in Stamm d7 erzielt werden. So wird das in den Expressionsvektor pDG148 insertierte *rnpA*-Gen beispielsweise stark exprimiert, wenn es direkt unter die Kontrolle des *spac*-Promotors gestellt und mit IPTG induziert wird. Demgegenüber wird die Expressionsrate stark reduziert, wenn es als $\Delta rpmH$ -*rnpA*-Genfusion unter die Kontrolle des *spac*-Promotors gestellt und nicht mit IPTG induziert wird (\Rightarrow Basalexpression). Auf diese Weise können über die Abhängigkeit von der *rnpA*-Expressionsstärke auch Aussagen über die Komplementationeffizienz gemacht werden.

Ursprünglich waren mit der *B. subtilis*-Mutante Komplementations-Analysen geplant, die Struktur-Funktions-Beziehungen bakterieller RNase P-Proteine aufzeigen sollten. Hierzu sollten konservierte Positionen bakterieller RNase P-Proteine mutiert und deren Auswirkung auf die Funktionalität *in vivo* untersucht werden. Allerdings wurde parallel ein vergleichbarer Versuchsansatz in einem bereits vorhandenen *E. coli*-Mutantenstamm (*rnpA49*, NHY322) durchgeführt (Jovanovic et al., 2002). Eine Mutation im chromosomalen *rnpA*-Gen dieses Stammes führt dazu, daß das kodierte Protein (C5 R46H) bei höheren Temperaturen nicht mehr funktionell ist. Dies ermöglicht eine Kultivierung der Zellen bei einer permissiven (30 °C) und einer restriktiven (43 °C) Temperatur. Der Nachteil bei diesem *E. coli* Stamm NHY322 ist jedoch, daß das chromosomal kodierte RNase P-Protein bei der restriktiven Temperatur weiterhin exprimiert wird. Es kann folglich nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß die Ergebnisse der Komplementationsanalysen durch dieses Protein beeinflusst wurden. Außerdem kann die Funktion veränderter RNase P-Proteine nur unter Temperaturstressbedingungen (43 °C) untersucht werden. Demgegenüber kann in dem hier vorgestellten Stamm d7 die Expression des chromosomalen *rnpA*-Gens vollständig inhibiert werden, so daß ausschließlich die modifizierten plasmidkodierten Proteine exprimiert werden, und die Analysen lassen sich unter normalen Temperaturbedingungen durchführen. So könnten die mit *E. coli* NHY322 erzielten Ergebnisse mit Hilfe des *B. subtilis* Stammes d7 überprüft und entweder verifiziert oder relativiert werden.

Aminosäureseitenketten und Regionen des P-Proteins, die für die Interaktion mit der P-RNA bzw. dem prä-tRNA-Substrat wichtig sind, wurden bereits in der Literatur beschrieben. Durch das Einfügen von Mutationen bzw. Deletionen in das plasmidale *rnpA*-Gen könnten diese Positionen bzw. Sequenzabschnitte in homologen Komplementationsanalysen in Stamm d7 näher charakterisiert werden.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit demonstriert, daß beide Untereinheiten der RNase P in *B. subtilis* d7 überexprimiert werden können und eine Isolierung des *in vivo* rekonstituierten Holoenzym mittels Metall-Chelatchromatographie durchführbar ist. Für die weiteren Verwendungen muß nun noch eine geeignete Elutionsmethode erarbeitet werden. Die Elution des RNase P-Komplexes könnte durch eine Erniedrigung des pH-Wertes erfolgen. Die Histidine in dem *His-tag* besitzen einen pK_a von ungefähr 6 und die Imidazolringe werden bei Erniedrigung des pH-Wertes (pH 4,5-5,3) protoniert. Unter diesen Bedingungen können Histidine keinen Komplex mehr mit Nickel-Ionen bilden und die Histidin-markierten Proteine dissoziieren folglich von der Ni^{2+} -NTA-Matrix ab. Eine andere Möglichkeit wäre, das RNase P-Holoenzym mit Imidazol (250–500 mM) zu eluieren. Anschließend müßte zur Eliminierung des Imidazols ein Dialyseschritt angefügt werden und die Aktivität des auf diese Weise isolierten Holoenzym ermittelt werden.

Darüber hinaus könnte dieses Konzept dazu verwendet werden, zelluläre Interaktionspartner des RNase P-Enzyms zu identifizieren. Hierzu müßten die Elutionsfraktionen auf das Vorhandensein weiterer Protein- oder RNA-Moleküle hin analysiert werden. Wie anhand des *Coomassie*-gefärbten Gels in Abbildung 4.21 zu erkennen ist, sind in den Elutionsfraktionen mehrere Proteinbanden vorhanden. Das Eluat von der mit d7[p3d]-Zellysat (Expression von P-Protein ohne *His-tag*, Abb. 4.20) inkubierten Ni^{2+} -NTA-Sepharose sollte nur Matrix-bindende Moleküle enthalten. Hingegen sollte in den Elutionsfraktionen von der Ni^{2+} -NTA-Sepharose, die mit Zellysat von d7[p3dchis], d7[p3nHis] oder d7[p3nHis+*rnpB*] inkubiert wurden, zusätzlich potentielle RNase P-bindende Moleküle enthalten sein. Ein Vergleich der beiden Eluate könnte folglich die Identifizierung zellulärer Komponenten ermöglichen, die *in vivo* mit der RNase P interagieren. Dies könnte Hinweise auf weitere zelluläre Funktionen der RNase P liefern. Die Inkubationsbedingungen bzw. die Waschschritte bei dieser Isolierungsmethode müßten der Fragestellung entsprechend optimiert werden. Die Existenz solcher Interaktionen zwischen der RNase P und anderen Zellkomponenten in *B. subtilis* konnte durch eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit demonstriert werden. Demnach interagiert die RNase P - wie zuvor auch für das Enzym von *E. coli* berichtet - mit Ribosomen (Robertson et al., 1972; Barrera und Pan, 2004). Dieser Komplex bildet sich in *B. subtilis* nur mit dem dimeren RNase P-Holoenzym.

Zur Identifizierung weiterer Substrate der RNase P bzw. möglicher zusätzlicher zellulärer Funktionen des P-Proteins könnte die Microarray-Technologie eingesetzt werden. Neben der in dieser Arbeit beschriebenen *B. subtilis*-Mutante d7 mit einem reprimierbaren *rnpA*-Gen ist für diese Analysen eine weitere Mutante von *B. subtilis* verfügbar. Bei dieser Mutante SSB318 wurde das chromosomale *rnpB*-Gen - welches für die RNA-Untereinheit der RNase P kodiert - unter die Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *spac*-Promotors gestellt (C. Condon, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Frankreich; unveröffentlichte Ergebnisse). So

könnte das Expressions-Profil in den *B. subtilis*-Mutanten nach Abschalten der jeweiligen RNase P-Untereinheit mittels DNA-Chips analysiert und schließlich mit dem Wildtyp verglichen werden. Der Effekt einer RNase P-Depletion auf die Expression anderer Gene könnte mittels dieser beiden voneinander unabhängigen Zellsysteme besser evaluiert werden. Daß dieser methodische Ansatz praktikabel ist, zeigt z.B. eine von Li und Altman 2003 publizierte Arbeit. Durch eine Microarray-Analyse konnten die Autoren weitere Substrate der RNase P in *E. coli* nachweisen. Mit einer anderen Fragestellung beschäftigte sich die Arbeitsgruppe um Tao Pan. Diese fand mit Hilfe eines spezifisch für tRNAs entwickelten Microarrays heraus, daß die tRNA-Verteilung in *B. subtilis* neben der Transkription hauptsächlich durch ein Gleichgewicht zwischen tRNA-Prozessierung und prä-tRNA-Abbau bestimmt wird (Dittmar et al., 2004). Für diese Versuche wurde der Wildtyp-Stamm 168A1 und ein P-RNA-defizienter Mutantenstamm verwendet.

Eine andere interessante Fragestellung wäre, ob bzw. wie die Expression der RNase P-Untereinheiten in *B. subtilis* reguliert wird. So ist es denkbar, daß die Expression der beiden RNase P-Untereinheiten koordiniert erfolgt. Real-Time PCR- bzw. *Northern Blot*-Analysen mit dem Stamm d7 könnten dazu Informationen liefern. Nach dem Abschalten des *rnpA*-Gens in Mutante d7 könnte die Menge an *rnpA*-mRNA und P-RNA zeitabhängig mittels quantitativer PCR/*Northern Blot* bestimmt und verglichen werden. Wäre solch ein Regulationsmechanismus in *B. subtilis* vorhanden, durch den die zellulären Mengen der beiden Untereinheiten aneinander angeglichen werden, dann sollte das Konzentrationsverhältnis [P-Protein]/[P-RNA] auch bei veränderten Expressionsstärken annähernd konstant bleiben. Allerdings könnte mit diesem System kein Regulationsmechanismus identifiziert werden, der über die Transkription des P-Proteins erfolgt, da der native *rnpA*-Promotor in Stamm d7 gegen den Xylose-Promotor ausgetauscht wurde. Ein entsprechender Vergleich mit dem Stamm SBB318 könnte dabei komplementäre Informationen liefern.

5 Zusammenfassung

Die RNase P ist ein an der tRNA-Prozessierung beteiligtes essentielles Enzym. Die bakterielle RNase P besteht aus einer RNA-Untereinheit und aus einer Proteinuntereinheit, wobei die katalytische Aktivität von der RNA-Untereinheit vermittelt wird. Demnach ist die bakterielle RNase P ein echtes Ribozym. Allerdings ist die vom *rnpA*-Gen kodierte Proteinuntereinheit in allen bislang untersuchten bakteriellen RNase P-Enzymen essentiell. Obwohl die RNase P eine eher einfache enzymatische Reaktion katalysiert, wurde sie im Verlauf der Evolution – wenn man von der Theorie der sogenannten RNA-Welt ausgeht – nicht durch ein reines Proteinenzym ersetzt. Die Ursache dafür, daß die RNase P-RNA-Untereinheit in allen Organismen – mit Ausnahme der Chloroplasten höherer Pflanzen – erhalten blieb, ist bislang ungeklärt.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Konstruktion einer chromosomalen Mutante von *B. subtilis* mit reprimierbarer *rnpA*-Expression. Hierfür wurde das native *rnpA*-Gen unter die Kontrolle des regulierbaren Xylose-Promotors gestellt. Die Transkription an diesem Promotor wird nur in Gegenwart von Xylose initiiert, in Abwesenheit von Xylose hingegen wird der Promotor durch einen Repressor inaktiviert. Über den Vorgang der homologen Rekombination konnte die native chromosomale *rnpA*-Region von *B. subtilis*-Stamm YB886 erfolgreich gegen die entsprechend modifizierte Region ausgetauscht und der gewünschte *B. subtilis*-Stamm isoliert werden. Die Charakterisierung und Verifizierung der als d7 bezeichneten Mutante erfolgte mittels verschiedener molekularbiologisch-genetischer Methoden. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die chromosomale *rnpA*-Expression in dem *B. subtilis*-Stamm d7 in Abwesenheit von Xylose effektiv inhibiert wird. Auf diese Weise konnte mit dem konstruierten Stamm auch erstmals *in vivo* bewiesen werden, daß das *rnpA*-Gen in *B. subtilis* essentiell ist.

In Bakterien liegt das RNase P-Protein-kodierende *rnpA*-Gen häufig unmittelbar stromabwärts des *rpmH*-Gens, welches das ribosomale L34-Protein kodiert. Beide Gene bilden vermutlich eine Transkriptionseinheit und werden koordiniert exprimiert. In der Zelle ist der Bedarf an beiden Proteinen jedoch sehr unterschiedlich. So wurde für *E. coli* berechnet, daß das Verhältnis Ribosomen/RNase P ≈ 60 -100 ist (Dong et al. 1996). Während der Konstruktion der *B. subtilis*-Mutante konnten Beobachtungen gemacht werden, die auf das Vorhandensein eines negativ wirkenden Regulationselements im *rpmH-rnpA*-Operon hindeuten, das die Expressionsrate des *rnpA*-Gens reduziert.

Weiterhin konnte erfolgreich demonstriert werden, daß der d7-Stamm für homologe Komplementationsstudien geeignet ist. So konnte der Wachstumsdefekt der Mutante in Abwesenheit von Xylose durch plasmidkodiertes P-Protein aufgehoben werden. Plasmidal

exprimierte *rnpA*-Gene können folglich die Funktionen des inaktivierten chromosomalen *rnpA*-Gens ersetzen. Die konstruierte *B. subtilis*-Mutante erwies sich somit als wertvolles Werkzeug für *in vivo*-Analysen zur Funktion des RNase P-Proteins. Durch die 1998 veröffentlichte Röntgenkristallstruktur des RNase P-Proteins von *B. subtilis* (Stams et al., 1998) wurde zudem eine präzisere strukturbasierte Konzeption von Proteinvarianten – beispielsweise durch das Einfügen von Deletionen, Insertionen und Mutationen in die plasmidalen *rnpA*-Gene – möglich.

In der Literatur wurde beschrieben, daß *in vitro* funktionelle Hybridenzyme mit RNase P-Untereinheiten aus *E. coli* und *B. subtilis* bzw. *E. coli* und *Synechocystis* gebildet werden können. Anhand dieser Ergebnisse war es naheliegend, diese beiden Proteinuntereinheiten in dem *B. subtilis*-Stamm d7 einleitend für weitere heterologe Komplementationstudien zu testen. Die plasmidkodierte heterologen RNase P-Proteine aus dem gramnegativen Bakterium *E. coli* und aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 waren beide in der Lage, die essentiellen Funktionen des nativen P-Proteins in *B. subtilis* zu ersetzen. Es gelang zudem, die Expression der heterologen Proteine auf RNA- und Proteinebene nachzuweisen. Damit wurde erstmals *in vivo* gezeigt, daß die Proteinkomponente einer Typ A RNA-Untereinheit – in diesem Fall das RNase P-Protein aus *E. coli* - mit der Typ B RNA-Untereinheit aus *B. subtilis* ein funktionelles Hybridenzym bilden kann. Auch die erfolgreiche Komplementation mit einem cyanobakteriellen RNase P-Protein ist interessant, da sich die Substratbindung/-erkennung der RNase P aus Cyanobakterien von der aus anderen Bakterien unterscheidet. So konnten Pascual und Vioque (1999) nachweisen, daß die 3'-terminale CCA-Sequenz des Substrats – welches eine wichtige Determinante bei der Substratbindung in *E. coli* ist – in Cyanobakterien den gegenteiligen Effekt besitzt. Die cyanobakterielle RNase P besitzt eine größere Präferenz für Substrate ohne 3'-terminale CCA-Sequenz.

Ferner konnte demonstriert werden, daß die d7-Mutante für die Überexpression und affinitätschromatographische Isolierung funktioneller, *in vivo* assemblierter RNase P genutzt werden kann. In diesem Zusammenhang gelang die simultane Überexpression der Protein- und RNA-Untereinheit der RNase P in *B. subtilis* d7. Dies gelang durch die Transformation der d7-Mutante mit einem Expressionsvektor, der die beiden für die RNase P-Untereinheiten kodierenden Gene *rnpA* und *rnpB* trägt. Im Gegensatz zu *E. coli* hat die Überexpression des RNase P-Proteins in *B. subtilis* offensichtlich keinen toxischen Effekt auf die Zellen. Die Affinitätsaufreinigung von *in vivo* rekonstituiertem RNase P-Holoenzym gelang im Anschluß erfolgreich über plasmidkodierte P-Protein, das am N-terminalen Ende mit einer Oligo-Histidin-Sequenz markiert war. Die Anreicherung konnte über die katalytische RNase P-Aktivität bestimmt werden. Diese Ergebnisse eröffnen die Perspektive, zelluläre Interaktionspartner der RNase P durch Kopurifizierung zu identifizieren.

6 Literaturverzeichnis

Alifano, P., Rivellini, F., Piscitelli, C., Arraiano, C.M., Bruni, C.B. und Carlomagno, M.S. (1994) Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes Dev.* **8(24)**: 3021-3031.

Altman, S. (1995) RNase P in research and therapy. *Bio/Technology* **13**: 327-329.

Altman, S. und Kirsebom, L. : Ribonuclease P, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, 1999.

Atsumi, S., Ikawa, Y., Shiraishi, H. und Inoue, T. (2001) Design and development of a catalytic ribonucleoprotein. *EMBO J.* **20**: 5453-5460.

d'Aubenton-Carafa Y., Brody, Y. And Thermes, C. (1990) Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.* **216**: 835-858.

Baer, M. und Altman, S. (1985) A catalytic RNA and its gene from *Salmonella typhimurium*. *Science* **228**: 999-1002.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2,4 Å resolution. *Science* **289**: 905-920.

Barrera, A., Fang, X., Jacob, J., Casey, E., Thiyagarajan, P und Pan, T. (2002) Dimeric and monomeric *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme in the absence and presence of pre-tRNA substrates. *Biochemistry* **41**: 12986-12994.

Barrera, A und Pan, T. (2004) Interaction of the *Bacillus subtilis* RNase P with the 30S ribosomal subunit. *RNA* **10**: 482-492.

Bartel, D.P. und Szostak, J.W. (1993) Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science* **261**: 1411-1418.

Baum, M., Cordier, A. und Schön, A. (1996) RNase P from a photosynthetic organelle contains an RNA homologous to the cyanobacterial counterpart. *J. Mol. Biol.* **257(1)**: 43-52.

Beaudry, A.A. und Joyce, G.F. (1992) Directed evolution of an RNA enzyme. *Science* **257**: 635-641.

Beebe, J.A., Kurz, J.C. und Fierke, C.A. (1996) Magnesium ions are required by *Bacillus subtilis* ribonuclease P RNA for both binding and cleaving precursor tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **35**: 10493-10505.

Bhavsar, A. P., Zhao, X. und Brown, E. D. (2001) Development and characterization of a xylose-dependent system for expression of cloned genes in *Bacillus subtilis*: conditional complementation of a teichoic acid mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(1)**: 403-410.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.

Birnboim H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255.

Biswas, R., Ledman, D.W., Fox, R.O., Altman, S. und Gopalan, V. (2000) Mapping RNA-protein interactions in ribonuclease P from *Escherichia coli* using disulfide-linked EDTA-Fe. *J. Mol. Biol.* **296(1)**: 19-31.

Boomershine, W.P., McElroy, C.A., Tsai, H-Y., Wilson, R.C., Gopalan, V. und Foster, M.P. (2003) Structure of Mth11/Mth Rpp29, an essential protein subunit of archaeal and eukaryotic RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100(26)**: 15398-15403.

Bränvall, M., Pettersson, F.B.M. und Kirsebom, L.A (2002) The residue immediately upstream of the RNase P cleavage site is a positive determinant. *Biochimie* **84(8)**: 693-703.

Bränvall, M., Pettersson, F.B.M. und Kirsebom, L.A (2003) Importance of the +73/294 interaction in *Escherichia coli* RNase P RNA substrate complexes for cleavage and metal ion coordination. *J. Mol. Biol.* **325(4)**: 697-709.

Brown, J.W. und Pace, N.R. (1992) Ribonuclease P RNA and protein subunits from bacteria. *Nucleic Acids Res.* **20(7)**: 1451-1456.

Brown, J.W., Haas, E.S. und Pace, N.R. (1993) Characterization of ribonuclease P RNAs from thermophilic bacteria. *Nucleic Acids Res.* **21**: 671-679.

Brown, J.W. Nolan, J.M., Haas, E.S., Rubio, M.A., Major, F. und Pace, N.R. (1996) Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural microbial populations reveals tertiary structure elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93(7)**: 3001-3006.

Busch, S., Kirsebom, L.A., Notbohm, H. und Hartmann, R.K. (2000) Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA. *J. Mol. Biol.* **299**: 941-951.

Burgin, A.B. und Pace, N.R. (1990) Mapping the active site of ribonuclease P RNA using a substrate containing a photoaffinity agent. *EMBO J.* **9(12)**: 4111-4118.

Carr, D.W. und Scott, J.D. (1992) Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. *TIBS* **17**: 246-249.

Cate, J.H., Gooding, A.R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B.L., Szewczak, A.A., Kundrot, C.E., Cech, T.R. und Doudna, J.A. (1996) RNA tertiary structure mediation by adenosine platforms. *Science* **273**: 1696-1699.

Cate, J.H., Gooding, A.R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B.L., Kundrot, C.E., Cech, T.R. und Doudna, J.A. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science* **273**: 1678-1685.

Chamberlain, J.R., Lee, Y., Lane, W.S. und Engelke, D.R. (1998) Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* **12(11)**: 1678-1690.

Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., Kaplan, J-C. und Kahn, A. (1990) Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.* **187**: 691-698.

Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. und Jay, E. (1994) Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **22(23)**: 4953-4957.

Chen, Y., Li, X. und Gegenheimer, P. (1997) Ribonuclease P catalysis requires Mg^{2+} coordinated to the pro- R_p oxygen of the scissile bond. *Biochemistry* **36**: 2425-2438.

- Chen, Y. und Pace, N.R. (1997) Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA. *RNA* **3**: 557-560.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162(1)**: 156-159.
- Chomczynski, P. und Mackey, K. (1995) Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal. Biochem.* **225(1)**: 163-164.
- Christian, E.L., McPheeters, D.S. und Harris, M.E. (1998) Identification of individual nucleotides in the bacterial ribonuclease P ribozyme adjacent to the pre-tRNA cleavage site by short-range photo-cross-linking. *Biochemistry* **37(50)**: 17618-17628.
- Christian, E.L. und Harris, M.E. (1999) The track of the pre-tRNA 5'leader in the ribonuclease P ribozyme-substrate complex. *Biochemistry* **38(39)**: 12629-12638.
- Christian, E.L., Kaye, N.M. und Harris, M.E. (2000) Helix P4 is a divalent metal ion binding site in the conserved core of the ribonuclease P ribozyme. *RNA* **6**: 511-519.
- Christian, E.L., Kaye, N.M. und Harris, M.E. (2002) Evidence for a polynuclear metal ion binding site in the catalytic domain of ribonuclease P RNA. *EMBO J.* **21(9)**: 2253-2262.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16 (22)**: 10881-10890.
- Crary, S.M., Niranjanakumari, S. und Fierke, C.A. (1998) The protein component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **37(26)**: 9409-9416.
- Dahl, M. K., Degenkolb, J. und Hillen, W. (1994) Transcription of the *xyl* operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base pairs. *J. Mol. Biol.* **243**: 423-424.
- Dahl, M. K., Schmiedel, D. und Hillen, W. (1995) Glucose and Glucose-6-Phosphate interaction with *xyl* repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. *J. Bacteriol.* **177**: 5467-5472.

- Dang, Y.L. und Martin, N.C. (1993) Yeast mitochondrial RNase P. Sequence of the RPM2 gene and demonstration that its product is a protein subunit of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **268**: 19791-19796.
- De Smit, M.H. und Van Duin, J. (1994) Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J. Mol. Biol.* **235(1)**: 173-184.
- Dittmar, A.K., Mobley, E.V., Jancso Radek, A. und Pan, T. (2004) Exploring the regulation of tRNA distribution on the genomic scale. *J. Mol. Biol.* **337**: 31-47.
- Dong, H., Kirsebom, L. A. und Nilsson, L. (1996) Growth Rate Regulation of 4,5 S RNA and M1 RNA the Catalytic Subunit of *Escherichia coli* RNase P. *J. Mol. Biol.* **261**: 303-308.
- Easterwood, T.R. und Harvey, S.C. (1997) Ribonuclease P RNA: models of the 15/16 bulge from *Escherichia coli* and the P15 stem loop of *Bacillus subtilis*. *RNA* **3(6)**: 577-585.
- Eckstein, F. und Lilley, D.M.J. (1996) Nucleic Acids and Molecular Biology. Catalytic RNA, Vol. 10. Springer, Berlin.
- Eichenbaum, Z., Federle, M. J., Marra, D., De Vos, W. M., Kuipers, O. P., Kleerebezem, M. und Scott, J. R. (1998) Use of Lactococcal *nisA* promotor to regulate gene expression in Gram-positive bacteria: comparison of induction level and promotor strength. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(8)**: 2763-2769.
- Fang, X-W., Yang, X-J., Littrell, K., Niranjanakumari, S., Thiyagarajan, P., Fierke, C., Sosnick, T.R. und Pan, T. (2001) The *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme contains two RNase P RNA and two RNase P protein subunits. *RNA* **7**: 233-241.
- Forster, A.C. und Altman, S. (1990) External guide sequences for an RNA enzyme. *Science* **249**: 783-786.
- Frank, D.N., Adamidi, C., Ehringer, M.A., Pitulle, C. und Pace, N.R. (2000) Phylogenetic-comparative analysis of the eukaryal ribonuclease P RNA. *RNA* **6(12)**: 1895-1904.
- Fujita J., Miwa, Y., Galinier, A. und Deutscher, J. (1995) Specific recognition of the *Bacillus subtilis* *gnt cis*-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol. Microbiol.* **17**: 953-960.

- Gardiner, K.J., Marsh, T.L., Pace, N.R. (1985) Ion dependence of the *Bacillus subtilis* RNase P reaction. *J. Biol. Chem.* **260(9)**: 5415-5419.
- Gärtner, D., Geissendorfer, M. and Hillen, W. (1988) Expression of the *Bacillus subtilis* xyl operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *J. Bacteriol.* **170(7)**: 3102-3109.
- Gaur, R.K., Hanne, A., Conrad, F., Kahle, D. und Krupp, G. (1996) Differences in the interaction of *Escherichia coli* RNase P RNA with tRNAs containing a short or a long extra arm. *RNA* **2(7)**: 674-681.
- Gegenheimer, P. (1995-96) Structure, mechanism and evolution of chloroplast transfer RNA processing systems. *Mol. Biol. Rep.* **22(2-3)**: 147-150.
- Gold, L. (1988) Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 199-233.
- Gopalan, V., Baxevanis, A. D., Landsman, D. und Altman, S. (1997) Analysis of the functional role of conserved residues in the protein subunit or Ribonuclease P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **267**: 818-829.
- Grabowski, P.J., Zaug, A.J. und Cech, T.R. (1981) The intervening sequence of the ribosomal RNA precursor is converted to a circular RNA in isolated nuclei of *Tetrahymena*. *Cell* **23(2)**: 467-476.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. und Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35(3Pt2)**: 849-857.
- Guerrier-Takada, C und Altman, S. (1984) Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription *in vivo*. *Science* **223(4633)**: 285-286.
- Guerrier-Takada, C., van Belkum, A., Pleij, C.W.A. und Altman, S. (1988) Novel reactions of RNase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell* **53**: 267-272.
- Haas, E.S., Morse, D.P., Brown, J.W., Schmidt, F.J. und Pace, N.R. (1991) Long-range structure in ribonuclease P RNA. *Science* **254**: 853-856.

- Haas, E.S., Brown, J.W., Pitulle, C. und Pace, N.R. (1994) Further perspective on the catalytic core and secondary structure of ribonuclease P RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2527-2531.
- Haas, E.S. und Brown, J.W. (1998) Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res.* **26(18)**: 4093-4099.
- Hall, T.A. und Brown, J.W. (2002) Archaeal RNase P has multiple protein subunits homologous to eukaryotic nuclear RNase P proteins. *RNA* **8(3)**: 296-306.
- Hampel, A. und Tritz, R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-) sTRSV sequence. *Biochemistry* **28**: 4929-4933.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation on *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166(4)**: 557-580.
- Hansen, F. G., Hansen, E. B. and Atlung, B. (1982) The nucleotide sequence of the *dnaA* gene promotor and of the adjacent *rpmH* gene, coding for the ribosomal protein L34, of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **1**: 1043-1048.
- Hansen, F. G., Hansen, E. B. and Atlung, T. (1985) Physical mapping and nucleotide sequence of the *mpA* gene that encodes the protein component of ribonuclease P in *Escherichia coli*. *Gene* **38**:85-93.
- Hardt, W.D., Schlegl, J., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1993) Role of the D arm and the anticodon arm in tRNA recognition by eubacterial and eukaryotic RNase P enzymes. *Biochemistry* **32(48)**: 13046-13053.
- Hardt, W.D., Warnecke, J.M., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1995) Rp-phosphorothioate modifications in RNase P RNA that interfere with tRNA binding. *EMBO J.* **14**: 2935-2944.
- Hardt, W.D., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1996) Rp-deoxy-phosphorothioate modification interference experiments identify 2'-OH groups in RNase P RNA that are crucial to tRNA binding. *RNA* **2**: 1189-1198.

Harris, M.E. und Pace, N.R. (1995) Identification of phosphates involved in catalysis by the RNase P RNA. *RNA* **1**: 210-218.

Harris; M.E., Kazantsev, A.V., Chen, J.L. und Pace, N.R. (1997) Analysis of the tertiary structure of the ribonuclease P ribozyme-substrate complex by site-specific photoaffinity crosslinking. *RNA* **3(6)**: 561-576.

Harris, M.E. und Christian, E.L. (2003) Recent insights into the structure and function of the ribonucleoprotein enzyme ribonuclease P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13(3)**: 325-333.

Hartmann, R.K., Heinrich, Schlegl, J. und Schuster, H. (1995) Precursor of C4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7 is a substrate for RNase P of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92(13)**: 5822-5826.

Hartmann, E. und Hartmann, R.K. (2003) The enigma of RNase P evolution. *Trends Genet.* **19(10)**: 561-569.

Haseloff, J. und Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **334**: 585-591.

Heide, C., Feltens, R. und Hartmann, R.K. (2001) Purine N7 groups that are crucial to the interaction of *Escherichia coli* RNase P RNA with tRNA. *RNA* **7(7)**: 958-968.

Heide, C., Pfeiffer, T., Nolan, J.M. und Hartmann, R.K. (1999) Guanosine 2-NH₂ groups of *Escherichia coli* RNase P RNA involved in intramolecular tertiary contacts and direct interactions with tRNA. *RNA* **5**: 102-116.

Henkin, T. M. (1996) The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 9-15.

Hoffman, W.L., Jump, A.A., Kelly, P.J. und Ruggles, A.O. (1991) Binding of antibodies and other proteins to nitrocellulose in acidic, basic and chaotropic buffers. *Anal. Biochem.* **198**: 112-118.

Holbrook, S.R., Cheong, C., Tinoco, I. Jr. und Kim, S.H. (1991) Crystal structure of an RNA double helix incorporating a track of non-Watson-Crick base pairs. *Nature* **353**: 579-581.

Holm, P.S. und Krupp, G. (1992) The acceptor stem in pre-tRNAs determines the cleavage specificity of RNase P. *Nucleic Acids Res.* **20**: 421-423.

Houser-Scott, F., Xiao, S., Millikin, C.E., Zengel, J.M., Lindahl, L. und Engelke, D.R. (2002) Interactions among the protein and RNA subunits of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(5): 2684-2689.

Jaffe, E.K. und Cohn, M. (1978) Divalent cation-dependent stereospecificity of adenosine 5'-O-(2-thiotriphosphate) in the hexokinase and pyruvate kinase reactions. The absolute stereochemistry of the diastereoisomers of adenosine 5'-O-(2-thiotriphosphate). *J. Biol. Chem.* **253**: 4823-4825.

Jarrous, N. und Altman, S. (2001) Human ribonuclease P. *Methods Enzymol.* **342**: 93-100.

Jiang, T., Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (2001) Protein-RNA interactions in the subunits of human nuclear RNase P. *RNA* **7**: 937-941.

Jovanovic, M., Sanchez, R., Altman, S. und Gopalan, V. (2002) Elucidation of structure-function relationships in the protein subunit of bacterial RNase P using a genetic complementation approach. *Nucleic Acids Res.* **30**(23): 5065-5073.

Kahle, D., Wehmeyer, U. und Krupp, G. (1990) Substrate recognition by RNase P and by the catalytic M1 RNA: identification of possible contact points in pre-tRNAs. *EMBO J.* **9**: 1929-1937.

Kaye, N.M., Christian, E.L. und Harris, M.E. (2002) NAIM and site-specific functional group modification analysis of RNase P RNA: magnesium dependent structure within the conserved P1-P4 multihelix junction contributes to catalysis. *Biochemistry* **41**: 4533—4545.

Kazantsev, A.V. und Pace, N.R. (1998) Identification by modification-interference of purine N-7 and ribose 2'-OH groups critical for catalysis by bacterial ribonuclease P. *RNA* **4**: 937-947.

Kazantsev, A.V., Krivenko, A.A., Harrington, D.J., Carter, R.J., Holbrook, S.R., Adams, P.D. und Pace, N.R. (2003) High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(13): 7497-7502.

Kent, O., Chaulk, S.G. und MacMillan, A.M. (2000) Kinetic analysis of the M1 RNA folding pathway. *J. Mol. Biol.* **304(5)**: 699-705.

Khasanov, F.K., Zvingila, D.J., Zainullin, A.A., Prozorov, A.A. und Bashkirov, V.I. (1992) Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70 bp of homology. *Mol. Gen. Genet.* **234(3)**: 494-497.

Kim, M., Park, B.H. und Lee, Y. (2000) Effects of terminal deletions in C5 protein on promoting RNase P catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**: 118-123.

Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H., Seeman, N.C. und Rich, A. (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**: 435-440.

Kirsebom, L.A. und Altman, S. (1989) Reaction in vitro of some mutants of RNase P with wild-type and temperature-sensitive substrates. *J. Mol. Biol.* **207(4)**: 837-840.

Kirsebom, L.A. und Svard, S.G. (1994) Base pairing between *Escherichia coli* RNase P and its substrate. *EMBO J.* **13(20)**: 4870-4876.

Kirsebom, L.A. und Vioque, A. (1995-1996) RNase P from bacteria. Substrat recognition and function of the protein subunit. *Mol. Biol. Rep.* **22**: 99-109.

Kole, R. und Altman, S. (1981) Properties of purified ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **20(7)**: 1902-1906.

Koizumi, M., Soukup, G.A., Kerr, J.N. und Breaker, R.R. (1999) Allosteric selection of ribozymes that respond to the second messengers cGMP and cAMP. *Nat. Struct. Biol.* **6(11)**: 1062-1071.

Komatsu, Y., Nobuoka, K., Karino-Abe, N., Matsuda, A. und Ohtsuka, E. (2002) In vitro selection of hairpin ribozymes activated with short oligonucleotides. *Biochemistry* **41(29)**: 9090-9098.

Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. und Inokuchi, H. (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9223-9227.

- Krasilnikov, A. S., Yang, X., Pan, T. und Mondragon, A. (2003) Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature* **421(6924)**: 760-764.
- Kraus, A., Hueck, C., Gärtner, D. und Hillen, W. (1994) Catabolite Repression of the *Bacillus subtilis xyl* Operon Involves a *cis* Element Functional in the Context of an Unrelated Sequence, and Glucose Exerts Additional *xylR*-Dependent Repression. *J. Bacteriol.* **176(6)**: 1738-1745.
- Kreuzer, P., Gärtner, D., Allmannsberger, R. and Hillen, W. (1989) Identification and sequence analysis of the *Bacillus subtilis* W23 *xylR* gene and *xyl* operator. *J. Bacteriol.* **171(7)**: 3840-3845.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. und Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31(1)**: 147-157.
- Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1996) Different cleavage sites are aligned differently in the active site of M1 RNA, the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6085-6090.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Kurz, J.C., Niranjanakumari, S. und Fierke, C.A. (1998) Protein component of *Bacillus subtilis* RNase P enhances specifically the affinity for precursor-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **37**: 2393-2400.
- Kurz, J.C. und Fierke, C.A. (2000) Ribonuclease P: a ribonucleoprotein enzyme. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 553-558.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **10(3-4)**:203-209.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(259)**: 680-685.

LaGrandeur, T.E., Hüttenhofer, A., Noller, H.F. und Pace, N.R. (1994) Phylogenetic comparative chemical footprint analysis of the interaction between ribonuclease P RNA and tRNA. *EMBO J.* **13**: 3945-3952.

Li, Y. und Altman, S. (2003) A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100(23)**: 13213-13218.

Liu, F und Altman, S. (1994) Differential evolution of substrates for an RNA enzyme in the presence and absence of its protein cofactor. *Cell* **77**: 1093-1100.

Loria, A. und Pan, T. (1997) Recognition of the T stem-loop of a pre-tRNA substrate by the ribozyme from *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **36**: 6317-6325.

Loria, A. und Pan, T. (1998) Recognition of the 5' leader and the acceptor stem of a pre-tRNA substrate by the ribozyme from *Bacillus subtilis* RNase P. *Biochemistry* **37(28)**: 10126-10133.

Loria, A., Niranjanakumari, S, Fierke, C.A. und Pan, T. (1998) Recognition of a pre-tRNA substrate by the *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme. *Biochemistry* **37(44)**: 15466-15473.

Loria, A. und Pan, T. (2001) Modular construction for function of a ribonucleoprotein enzyme: the catalytic domain of *Bacillus subtilis* RNase P complexed with *B. subtilis* RNase P protein. *Nucleic Acids Res.* **29(9)**: 1892-1897.

Ma, J., Campbell, A. und Karlin, S. (2002) Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J. Bacteriol.* **184(20)**: 5733-5745.

Mann, H., Ben-Asouli, Y., Schein, A., Moussa, S. und Jarrous, N. (2003) Eukaryotic RNase P: Role of RNA and protein subunits of a primordial catalytic ribonucleoprotein in RNA-based catalysis. *Mol Cell* **12**: 1-20.

Mans, R.M., Guerrier-Takada, C., Altman, S. und Pleij, C.W. (1990) Interaction of RNase P from *Escherichia coli* with pseudoknotted structures in viral RNAs. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3479-3487.

Marino, J.P., Gregorian, R.S.Jr., Csankovszki, G. und Crothers, D.M. (1995) Bent helix formation between RNA hairpins with complementary loops. *Science* **268**: 1448-1454.

Martin, N.C. und Lang, B.F. (1997) Mitochondrial RNase P: the RNA family grows. *Nucl.Acids Symp. Ser.* **36**: 42-44.

Massire, C., Jaeger, L. und Westhof, E (1997) Phylogenetic evidence for a new tertiary interaction in bacterial RNase P RNAs. *RNA* **3(6)**: 553-556.

McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T und Sueoka, N. (1986) The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* **15(2)**: 93-103.

Moran, C.P., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A.L., Pero, J. und Losick, R. (1982) Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 339-346.

Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L. und Strobel, S.A. (2000) A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* **289**: 947-950.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920-930.

Niranjanakumari, S., Stams, T., Crary, S. M., Christianson, D. W. und Fierke, C. A. (1998) Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15212-15217.

Nolan, J.M., Burke, D.H. und Pace, N.R. (1993) Circularly permuted tRNAs as specific photoaffinity probes of ribonuclease P RNA structure. *Science* **261**: 762-765.

Odell, L., Huang, V., Jakacka, M. und Pan, T. (1998) Interaction of structural modules in substrate binding by the ribozyme from *Bacillus subtilis* RNase P. *Nucleic Acids Res.* **26**: 3717-3723.

Oh, B.K. und Pace, N.R. (1994) Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4087-4094.

Pace, N.R. und Brown, J.W. (1995) Evolutionary perspective on the structure and function of ribonuclease P, a ribozyme. *J. Bacteriol.* **177(8)**: 1919-1928.

Pan, T., Loria, A. und Zhong, K. (1995) Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12510-12514.

Pan, T. und Sosnick, T.R. (1997) Intermediates and kinetic traps in the folding of a large ribozyme revealed by circular dichroism and UV absorbance spectroscopies and catalytic activity. *Nat. Struct. Biol.* **4(11)**: 931-938.

Panagiotidis, C. A., Drainas, D. and Huang, S.-C. (1992) Modulation of Ribonuclease P expression in *Escherichia coli* by Polyamines. *Int. J. Biochem.* **24(10)**: 1625-1631.

Pannucci, J.A., Haas, E.S., Hall, T.A., Harris, J.K. und Brown, J.W. (1999) RNase P RNAs from some archaea are catalytically active. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7803-7808.

Pascual, A. und Vioque, A. (1996) Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem.* **241(1)**: 17-24.

Pascual, A. und Vioque, A. (1999) Functional reconstitution of RNase P activity from a plastid RNA subunit and a cyanobacterial protein subunit. *FEBS Letters* **442**: 7-10.

Pearson R.G. (1963) Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 3533 – 3539

Peck-Miller, K.A. und Altman, S. (1991) Kinetics of the processing of the precursor to 4,5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **221(1)**: 1-5.

Pecoraro, V.L., Hermes, J.D. und Cleland, W.W. (1984) Stability constants of Mg^{2+} and Cd^{2+} complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of MgATP and MgADP. *Biochemistry* **23**: 5262-5271.

Pitulle, C., Garcia-Paris, M., Zamundio, K.R. und Pace, N.R. (1998) Comparative structure analysis of vertebrate ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* **26**: 3333-3339.

- Pley, H.W., Flaherty, K.M. und McKay, D.B. (1994) Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* **372**: 68-74.
- Puglisi, J.D., Wyatt, J.R., und Tinoco, I.Jr. (1990) Conformation of an RNA pseudoknot. *J. Mol. Biol.* **214**: 437-453.
- Reich, C., Gardiner, K. J., Olsen, G. J., Pace, B., Marsh, T. L. and Pace, N. R. (1986) The RNA Component of *Bacillus subtilis* RNase P. *J. Biol. Chem.* **261**(17): 7888-7893.
- Reich, C., Olsen, G.J., Pace, B. und Pace, N.R. (1988) Role of the protein moiety of the ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *Science* **239**: 178-181.
- Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D. und Gold, L. (1992) Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* **6**(9): 1219-1229.
- Rivera-Lèon R., Green C. J. and Vold, B. S. (1995) High level expression of Soluble Recombinant RNase P Protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**(9): 2564-2566.
- Robertson, H.D., Altman, S. und Smith, J.D. (1972) Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. *J. Biol. Chem.* **247**: 5243-5251.
- Rox, R., Feltens, R. Pfeiffer, T. und Hartmann, R.K. (2002) Potential contact sites between the protein and RNA subunit in the *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **315**(4): 551-560.
- Rygus, T. und Hillen, W. (1991) Inducible high level expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 594-599.
- Saenger, W. (1984) Principles of nucleic acid structure. *Springer-Verlag*.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350-1354.

- Sakai, H., Imamura, C., Osada, Y., Saito, R., Washio, T. und Tomita, M. (2001) Correlation between Shine-Dalgarno sequence conservation and codon usage of bacterial genes. *J. Mol. Evol.* **52**: 164-170.
- Sakano, H., Yamada, S., Ikemura, T., Shimura, Y. und Ozaki, H. (1974) Temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* for tRNA biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **1**: 355-371.
- Salinovich, O. und Montecarlo, R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**: 341-347.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.E. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166(2)**: 368-379.
- Schedl, P. und Primakoff, P. (1973) Mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for the synthesis of transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**: 2091-2095.
- Schlegl, J., Fürste, J.P., Bald, R., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1992) Cleavage efficiencies of model substrates for ribonuclease P from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*. *Nucleic Acids Res.* **20(22)**: 5963-5970.
- Scott, W.G., Finch, J.T. und Klug, A. (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell.* **81(7)**: 991-1002.
- Seidman, J.G. und McClain, W.H. (1975) Three steps in conversion of large precursor RNA into serine and proline transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72(4)**: 1491-1495.
- Sharkady, S.M. und Nolan, J.M. (2001) Bacterial ribonuclease P holoenzyme crosslinking analysis reveals protein interaction sites on the RNA subunit. *Nucleic Acids Res.* **29(18)**: 3848-3856.

- Shepard, H.M., Yelverton, E. und Goeddel, D.V. (1982) Increased synthesis in *E. coli* of fibroblast and leukocyte interferons through alterations in ribosome binding sites. *DNA* **1(2)**: 125-131.
- Sidote, D.J. und Hoffman, D.W. (2003) NMR structure of an archaeal homologue of ribonuclease P protein Rpp29. *Biochemistry* **42(46)**: 13541-13550.
- Siegel, R.W., Banta, A.B., Haas, E.S., Brown, J.W. und Pace, N.R. (1996) *Mycoplasma fermentans* simplifies our view of the catalytic core of ribonuclease P RNA. *RNA* **2(5)**: 452-462.
- Siew, D., Zahler, N.H., Cassano, A.G., Strobel, S.A. und Harris, M.E. (1999) Identification of adenosine functional groups involved in substrate binding by the ribonuclease P ribozyme. *Biochemistry* **38**: 1873-1883.
- Smith, D. und Pace, N.R. (1993) Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry* **32(20)**: 5273-5281.
- Southern, E.M. (1975) Long range periodicities in mouse satellite DNA. *J. Mol. Biol.* **94(1)**: 51-69.
- Spitzfaden, C., Nicholson, N., Jones, J. J., Guth, S., Lehr, R., Prescott, C. D., Hegg, L. A. und Eggleston, D. S. (2000) The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *J. Mol. Biol.* **295**: 105-115.
- Stams, T., Niranjanakumari, S., Fierke, C. und Christianson, D. W. (1998) Ribonuclease P protein structure: evolutionary origins in the translational apparatus. *Science* **280**: 752-755.
- Stragier, P., Bonamy, C. und Karmazyn-Campelli, C. (1988) Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression. *Cell* **52(5)**: 697-704.
- Svård, S.G und Kirsebom, L.A. (1992) Several regions of tRNA precursor determine the *Escherichia coli* RNase P cleavage site. *J. Mol. Biol.* **227(4)**: 1019-1031.
- Svård, S.G und Kirsebom, L.A. (1993) Determinants of *Escherichia coli* RNase P cleavage site selection: a detailed *in vitro* and *in vivo* analysis. *Nucleic Acids Res.* **21(3)**: 427-434.

Svård, S.G., Kagardt, U. und Kirsebom, L.A. (1996) Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate. *RNA* **2(5)**: 463-472.

Szewczak, A.A., Ortoleva-Donnelly, L., Ryder, S.P., Moncoeur, E. und Strobel, S.A. (1998) A minor groove RNA triple helix within the catalytic core of a group I intron. *Nat. Struct. Biol.* **5(12)**: 1037-1042.

Talbot, S.J. und Altman, S. (1994) Gel retardation analysis of the interaction between C5 protein and M1 RNA in the formation of the ribonuclease P holoenzyme in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33(6)**: 1399-1405.

Tallsjö, A. und Kirsebom, L. A. (1993) Product release is a rate-limiting step during cleavage by the catalytic RNA subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Nucleic Acids Res.* **21**: 51-57.

Tallsjö, A., Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1996) Interaction between *Escherichia coli* RNase P RNA and the discriminator base results in slow product release. *RNA* **2**: 299-307.

Thomas, B. C., Gao, L., Stomp, D., Li, X. und Gegenheimer, P.A. (1995) Spinach chloroplast RNase P: a putative protein enzyme. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **33**: 95-98.

Thomas, B. C. und Gegenheimer, P. (2000) Chloroplast ribonuclease P does not utilize the ribozyme-type pre-tRNA cleavage mechanism. *RNA* **6(4)**: 545-553.

Thurlow, D.L., Shilowski, D. und Marsh, T.L. (1991) Nucleotids in precursor tRNAs that are required intact for catalysis by RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res.* **19**: 885-891.

Tovey, E.R. und Baldo, B.A. (1987) Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membrane. *Electrophoresis* **8**: 384-387.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

Towbin, H. und Gordon J. (1988) Immunoblotting – an update. *Biochem. Soc. Trans.* **16**: 131.

Tsai, H-Y, Masquida, B., Biswas, R., Westhof, E. und Gopalan, V. (2003) Molecular Modeling of the three-dimensional structure of the bacterial RNase P holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **325**: 661-675.

Tuerk, C., Gauss, P., Thermes, C., Groebe, D.R., Gayle, M., Guild, N., Stormo, G., D'Aubenton-Carafa, Y., Uhlenbeck, O.C., Tinoco, I.Jr., Brody, E.N. und Gold, L. (1988) CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1364-1368.

Uhlenbeck, O.C. (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* **328**: 596-600.

Van Eenenaam, H., Pruijn, G.J. und van Venrooij, W.J. (1999) hPop4: A new protein subunit of the human RNase MRP and RNase P ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2465-2472.

Van Eenenaam, H., Jarrous, N., van Venrooij, W.J. und Pruijn, G.J. (2000) Architecture and function of the human endonucleases RNase P and RNase MRP. *IUBMB Life* **49**: 265-272.

Vehmaanperä, J. (1989) Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **52(1-2)**: 165-169.

Vellanoweth, R.L. und Rabinowitz, J.C. (1992) The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1105-1114.

Vioque, A., Arnez, J. und Altman, S.(1988) Protein-RNA interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **202(4)**: 835-845.

Warnecke, J.M., Fürtse, J.P., Hardt, W.D., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1996) Ribonuclease P (RNase P) RNA is converted to a Cd²⁺-ribozyme by a single R_p-phosphorothioate modification in the precursor tRNA at the RNase P cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8924-8928.

Warnecke, J.M., Held, R., Busch, S. und Hartmann, R.K. (1999) Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **290**: 433-445.

- Warnecke, J.M., Sontheimer, E.J., Piccirilli, J.A. und Hartmann, R.K. (2000) Active site constraints in the hydrolysis reaction catalyzed by bacterial RNase P: analysis of precursor tRNAs with a single 3'-S-phosphorothiolate internucleotide linkage. *Nucleic Acids Res.* **28(3)**: 720-727.
- Waugh, D.S., Green, C.J. und Pace, N.R. (1989) The design and catalytic properties of a simplified ribonuclease P RNA. *Science* **244**: 1569-1571.
- Westhof, E. und Michel, F. in *RNA-Protein interactions* (Hrsg.: Nagai, K., Mattaj, I.W.), IRL Press, New York. 1994. S. 25-51.
- Westhof, E., Wesolowski, D. und Altman, S. (1996) Mapping in three dimensions of regions in a catalytic RNA protected from attack by an Fe(II)-EDTA reagent. *J. Mol. Biol.* **258(4)**: 600-613.
- Wilfinger, W.W., Mackey K., Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**: 474-481.
- Wilhelm, M. und Hollenberg, C. P. (1984) Selective cloning of *Bacillus subtilis* xylose isomerase and xylulokinase genes in *Escherichia coli* by IS5-mediated expression. *EMBO J.* **3**: 2555-2560.
- Wilhelm, M. und Hollenberg, C. P. (1985) Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* xylose isomerase gene: extensive homology between *Bacillus* and the *E. coli* enzyme. *Nucleic Acids Res.* **13**: 5717-5722.
- Yansura, D.G. and Henner, D.J. (1984) Use of the *Escherichia coli* lac repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 439-443.
- Yasbin, R.E., Fields, P.I., Andersen, B.J. (1980) Properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives freed of their natural prophages. *Gene* **12**: 155-159.
- Zahler, N.H., Christian, E.L. und Harris, M.E. (2003) Recognition of the 5'-leader sequence of pre-tRNA substrates by the active site of ribonuclease P. *RNA* **9(6)**: 734-745.

Zuleeg, T., Hansen, A., Pfeiffer, T., Schubel, H., Kreutzer, R., Hartmann, R.K. und Limmer, S. (2001) Correlation between processing efficiency for ribonuclease P minimal substrates and conformation of the nucleotide –1 at the cleavage position. *Biochemistry* **40**: 3363-3369.

Lebenslauf

Name: Gößringer
Vorname: Markus
Geburtsdatum: 13.10.1967
Geburtsort: Isny/Allgäu

- 1967** **geboren in Isny/Allgäu**

- 1974 bis 1978** **Grundschule in Isny-Neutrauchburg**

- 1978 bis 1987** **Gymnasium in Isny**

- 1987** **Abitur (Erwerb der allgemeinen Hochschulreife)**

- 1988 bis 1989** **Zivildienst (Rehabilitationszentrum Stephanuswerk Isny)**

- 1990** **Immatrikulation an der Universität Konstanz für den
Studiengang Biologie**

- 1993** **Bestehen der Diplomvorprüfung und Beginn des Hauptstudiums**

- 1997** **Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Plattner am Lehrstuhl für Zellbiologie
und Ultrastrukturforschung (Thema: „Immunlokalisierung und
Charakterisierung des Exocytose-sensitiven Phosphoprotein
PP63 in *Paramecium tetraurelia*“)**

- 1999 bis 2003** **Doktorarbeit bei Prof. Dr. R. K. Hartmann am Institut für
Biochemie an der Medizinischen Universität zu Lübeck**

- 2004** **Doktorarbeit bei Prof. Dr. R. K. Hartmann am Institut für
Pharmazeutische Chemie an der Philipps-Universität
Marburg (Thema: „*In vivo*-Analysen zur Funktion bakterieller
RNase P-Proteine in *Bacillus subtilis*“)**

Eigene Publikationen

Kissmehl, R., Hauser, K., **Gössringer, M.**, Momayezi, M., Klauke, N. und Plattner, H. (1998) Immunolocalization of the exocytosis-sensitive phosphoprotein, PP63/parafusin, in *Paramecium* cells using antibodies against recombinant protein. *Histochem. Cell. Biol.* **110(1)**: 1-8.

Feltens, R. **Gössringer, M.**, Willkomm, D.K., Urlaub, H. und Hartmann, R.K. (2003) An unusual mechanism of bacterial gene expression revealed for the RNase P protein of *Thermus* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100(10)**: 5724-5729.

Tagungsbeiträge

Gössringer, M., Kretschmer-Kazemi Far, R. und Hartmann, R.K. (2000):

„In vivo analysis of RNase P protein function in *Bacillus subtilis*”

NorFa Network on Molecular Biology of RNA; Meeting in Uppsala, Schweden.

Gößringer, M., Willkomm, D.K., Urlaub, H., Hartmann, R.K. und Feltens, R. (2002):

„A novel mechanism of bacterial gene expression revealed for the RNase P protein of *Thermus thermophilus*”

Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie; RNA Meeting in Blaubeuren.

Gößringer, M., Kretschmer-Kazemi Far, R. und Hartmann, R.K. (2003):

„Genetic complementation in *Bacillus subtilis* for the study of bacterial RNase P proteins”

NorFa Network on Molecular Biology of RNA; Meeting in Amsterdam, Niederlande

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter dieser Arbeit, Prof. Dr. Roland K. Hartmann, für die jederzeitige Ansprechbarkeit beim Auftreten irgendwelcher Probleme sowie die zahlreichen wertvollen Diskussionen und Ratschläge, die neue Impulse für die Fertigstellung dieser Arbeit gegeben haben.

Vor allem möchte ich auch Dr. Rosel Kretschmer-Kazemi Far für die sehr gute Einarbeitung und Betreuung dieser Arbeit danken. Ihre fachmännischen Tipps zur „Handhabung“ von *Bacillus subtilis* und auch die Aufmunterungen, nachdem ich morgens mal wieder vor leeren Agarplatten stand, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

PD. Dr. Mario Mörl danke ich für das Zweitgutachten, Prof. Dr. Maike Petersen und PD. Dr. Klaus Reuter für die Beteiligung als Mitglieder der Prüfungskommission.

Bei Prof. Dr. Georg Sczakiel bedanke ich mich besonders für die gastfreundliche Aufnahme am Institut für Molekulare Medizin in Lübeck und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten.

Besonders danken möchte ich allen weiteren Mitgliedern der Molekularen Medizin in Lübeck, die mich so freundschaftlich bei sich aufgenommen und mir bei der Bewältigung der zahlreichen Probleme des Laboralltags geholfen haben:

Katrin Böttcher, Kirsten Frank, Herr Hein-Langendorf, Anne Hopert, Martina Jahnke, Gabi Kreutzfeldt, Jan Leppert, Marita Overhoff, Michael Schütt, Petra Teich, Jens Warnecke und Winfried Wünsche

sei an dieser Stelle gedankt. Es war eine schöne Zeit bei Euch.

Für die Hilfsbereitschaft, Toleranz und freundschaftliche Atmosphäre in- und außerhalb des Labors möchte ich der gesamten „Besatzung“ der Arbeitsgruppe Hartmann danken. Ein Extra-Dank geht an Simona Cuzic für die Hilfe beim Aktivitäts-Assay und Barbara Wegscheid für die Konstruktion des verzwickten *mpA-rnpB*-Plasmids. Ein Dankeschön auch an meine ehemaligen und jetzigen Mitstreiter Jasmin Aldag, Ralph Feltens, Heike Grügelsiepe und Dagmar Willkomm, mit denen man sich über gelungene Experimente freuen und, im Falle von mißglückten, sich gegenseitig wieder aufbauen konnte.

Und ein herzlicher Dank nicht zuletzt an alle Genannten und Nicht-Genannten Pro- und Eukaryonten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Selbstständigkeitserklärung

ich versichere, daß ich meine Dissertation

„In vivo-Analysen zur Funktion bakterieller RNase P-Proteine in *Bacillus subtilis*“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)